



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>C12N 15/55, 15/82, A01H 5/00, A23K 1/14, A61K 38/46, C10L 1/02, 1/14</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale: WO 98/17807</b> <b>(43) Date de publication internationale: 30 avril 1998 (30.04.98)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR97/01862 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 17 octobre 1997 (17.10.97) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 96/12665 17 octobre 1996 (17.10.96) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> BIOCEM (S.A.) [FR/FR]; Campus Universitaire des Cézeaux, 24, avenue des Landais, F-63170 Aubière (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> GRUBER, Véronique [FR/FR]; Biocem (S.A.), Campus Universitaire des Cézeaux, 24, avenue des Landais, F-63170 Aubière (FR). BOURNAT, Philippe [FR/FR]; Biocem (S.A.), Campus Universitaire des Cézeaux, 24, avenue des Landais, F-63170 Aubière (FR). MEROT, Bertrand [FR/FR]; Biocem (S.A.), Campus Universitaire des Cézeaux, 24, avenue des Landais, F-63170 Aubière (FR). <b>(74) Mandataire:</b> BREESE-MAJEORWICZ; 3, avenue de l'Opéra, F-75001 Paris (FR).	<b>(81) Etats désignés:</b> AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, brevet ARIPO (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <i>Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i>	
<b>(54) Title:</b> PANCREATIC LIPASES AND/OR RECOMBINANT COLIPASES AND DERIVED POLYPEPTIDES PRODUCED BY PLANTS, METHODS FOR OBTAINING THEM AND USE THEREOF <b>(54) Titre:</b> LIPASES PANCREATIQUES ET/OU COLIPASES RECOMBINANTES ET POLYPEPTIDES DERIVES PRODUITS PAR LES PLANTES, LEURS PROCÉDES D'OBTENTION ET LEURS UTILISATIONS <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns the use of a recombinant nucleotide sequence containing a DNAC coding for an element of the pancreatic lipase-colipase complex of mammals or for a derived protein or polypeptide, and the elements enabling a plant cell to produce this element, or the derived protein or polypeptide, coded for by said DNAC, in particular a promoter and a terminator of transcription identified by the transcriptional machinery of plant cells, for transforming plant cells in order to obtain, from these cells, or from the plants obtained from the latter, a recombinant element of the pancreatic lipase-colipase complex of mammals, or of a derived protein or polypeptide.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention concerne l'utilisation d'une séquence nucléotidique recombinante contenant, d'une part, un ADNc codant pour un élément du complexe lipase pancréatique-colipase de mammifères ou pour une protéine ou un polypeptide dérivé, et d'autre part, les éléments permettant à une cellule végétale de produire cet élément, ou la protéine ou le polypeptide dérivé, codé par ledit ADNc, notamment un promoteur et un terminateur de transcription reconnus par la machinerie transcriptionnelle des cellules végétales, pour la transformation de cellules de plantes en vue de l'obtention, à partir de ces cellules, ou de plantes obtenues à partir de ces dernières, d'un élément recombinant du complexe lipase pancréatique-colipase de mammifères, ou d'une protéine ou polypeptide dérivé.</p>		

### **UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION**

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce		de Macédoine	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun		démocratique de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CU	Cuba	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DK	Danemark	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
EE	Estonie	LR	Libéria	SG	Singapour		

LIPASES PANCREATIQUES ET/OU COLIPASES RECOMBINANTES ET  
POLYPEPTIDES DERIVES PRODUITS PAR LES PLANTES, LEURS  
PROCEDES D'OBTENTION ET LEURS UTILISATIONS

La présente invention a pour objet la production par les plantes de lipases pancréatiques et colipases recombinantes, notamment de la lipase pancréatique humaine recombinante (LPH) et/ou de la colipase pancréatique humaine (COLPH), de façon combinée ou séparée, et autres dérivés de ces dernières possédant une  
5 activité lipasique ou une activité de cofacteur de lipase le cas échéant, ainsi que leurs utilisations, notamment en tant qu'aliments fonctionnels, que compositions pharmaceutiques, ou dans des formulations enzymatiques à applications agro-alimentaires ou industrielles.

On connaît dans l'art antérieur le brevet WO 9300426 qui concerne une  
10 lipase pancréatique de mammifère et ses variantes. La description est basée sur le clonage et le séquençage de la lipase pancréatique de cobaye et le mode de production décrit est l'expression dans le champignon filamenteux *Aspergillus oryzae*. Cependant aucune indication n'est donnée dans WO 9300426 pour surmonter les particularités et difficultés imprévisibles propres à la transgénèse et à  
15 une telle production dans les plantes, par exemple dans le tabac, le maïs ou le colza.

L'action concertée de la lipase pancréatique et de la colipase permet l'hydrolyse des graisses dans le duodénum. En effet, le substrat naturel de la lipase pancréatique consiste en des triglycérides à chaînes longues dispersés dans la  
20 solution des sels biliaires micellaires. Cependant la lipase est fortement inhibée par les sels biliaires. Lorsque la lipase et la colipase sont présentes, cette inhibition est surmontée. Dans l'intestin, le complexe lipase pancréatique-colipase pancréatique est formé, catalysé par des acides gras à longues chaînes qui augmentent la liaison d'un facteur 100. Bien que la stoechiométrie lipase:colipase soit de 1:1, le ratio de  
25 concentration lipase-colipase est variable selon l'espèce considéré (Erlanson-Albertson, 1992). Chez le rat, le ratio lipase-colipase est inférieur à 1 (0,48) tandis que chez l'homme, il en est proche (1,05). Cette observation pourrait s'expliquer par le rôle potentiel de la colipase dans la régulation du poids de l'animal via son peptide d'activation, l'entérostatine.

30 La lipase pancréatique humaine (LPH) est une glycoprotéine de 449 acides aminés (AA) d'une masse moléculaire apparente d'environ 50 kilodaltons (kDa) synthétisée sous forme d'un précurseur de 465 AA contenant un peptide signal de 16 AA à l'extrémité N-terminale (Lowe et al., 1989). Des lipases (protéines ou

ADNc) pancréatiques ont été purifiées à partir de tissus ou organes de mammifères tels que le cheval, le porc, le lapin, le rat ou le cobaye. Les séquences en acides aminés présentent entre elles un pourcentage d'homologie d'au moins 80%, notamment d'au moins 80,6% à environ 84,6 (tableau 1). Les séquences nucléotidiques présentent entre elles un pourcentage d'homologie d'au moins 79%, notamment d'au moins 79,3 % à environ 87% (tableau 1).

Tableau 1 :

Origine	% séquences en AA par rapport à la séquence humaine	% séquences en nucléotides par rapport à la séquence humaine
cheval	84,6	87,0
porc	83,7	85,0
lapin	81,2	82,8
rat	80,6	79,3

Les caractéristiques des lipases pancréatiques sont les suivantes : elles sont activées par les interfaces lipides-eau (activation interfaciale) ; elles sont inhibées par les sels biliaires mais réactivées par la colipase (protéine activatrice) ; elles n'hydrolysent pas significativement les phospholipides.

La lipase pancréatique (triacylglycerol acylhydrolase, EC 3.1.1.3)) joue un rôle clé dans l'absorption des graisses alimentaires par l'hydrolyse des triglycérides en diglycérides, puis en monoglycérides et en acides gras libres. L'hydrolyse des triglycérides par la lipase pancréatique est inhibée par des concentrations physiologiques d'acides biliaires. Cette inhibition est surmontée par l'addition de colipase qui se fixe à la lipase et aux micelles lipidiques. La structure tridimensionnelle de la lipase pancréatique humaine a été déterminée par cristallographie aux rayons X (Winkler et al 1990). Elle a permis d'identifier le résidu catalytique Ser 152 appartenant à la triade Asp-His-Ser qui est chimiquement analogue mais structuellement différente des protéases à sérine. Ce site catalytique est couvert par une boucle de surface, et par conséquent inaccessible au solvant. L'activation interfaciale, propriété caractéristique des enzymes lipolytiques agissant sur des substrats insolubles dans l'eau aux interfaces eau-lipide, nécessite probablement une réorientation. La lipase pancréatique humaine est constituée de deux domaines, un domaine N-terminal comprenant les résidus 1 à 335, et un domaine C-terminal. Le domaine N-terminal contient le site actif, un site de glycosylation (Asn 166), un site de fixation de  $Ca^{2+}$ , et probablement un site liant l'héparine intestinale. Le domaine C-terminal contient le site de liaison de la colipase.

La colipase pancréatique est sécrétée à partir du pancréas sous forme d'un précurseur, la procolipase (Börgström et al. 1979). Elle facilite l'hydrolyse des lipides interfaciaux catalysée par la lipase pancréatique. La colipase pancréatique, de masse moléculaire apparente de 10kDa, confère une activité catalytique à la lipase pancréatique dans les conditions physiologiques (hautes concentrations en sels biliaires). La procolipase est constituée de 112 AA dont 17 correspondent au peptide signal. Les séquences en acides aminés et nucléotidique, de la colipase pancréatique humaine sont connues (Erlanson et al 1974 et Lowe et al. 1990).

Des colipases pancréatiques ont été isolées à partir de mammifères. Par exemple, la colipase pancréatique de lapin présente 82,7% d'homologie de séquence en AA avec la colipase humaine. L'étude cristallographique de la structure de la colipase et son interaction avec la lipase pancréatique ont été étudiées (Egloff et al., 1995) : La surface de la colipase peut être divisée en une partie relativement hydrophile interagissant avec la lipase et une partie plus hydrophobe aux extrémités de boucles protéiques. L'interaction entre la colipase et le domaine C-terminal de la lipase est stabilisée par 8 liaisons hydrogène et environ 80 contacts de Van der Waals. Lorsque la boucle de surface (ou le «couvercle») couvrant le site catalytique libère l'accès à celui-ci, 3 liaisons hydrogènes et environ 28 contacts de Van der Waals supplémentaires apparaissent, expliquant la haute affinité apparente en présence d'une interface lipides/eau.

*In vitro*, dans certaines conditions, on peut mettre en évidence une synergie d'action entre les lipases gastrique et pancréatique sur l'hydrolyse de triglycérides à chaînes longues (Gargouri, Y. *et al.*, 1989).

On connaît plusieurs situations pathologiques (mucoviscidose, insuffisance pancréatique exocrine) où les patients sont totalement ou partiellement dépourvus de sécrétion pancréatique exocrine et donc des enzymes nécessaires à l'hydrolyse des aliments (amylases, lipases, protéases). La non-absorption des graisses au niveau intestinal, et notamment des triglycérides à longues chaînes, se traduit par une augmentation très importante de la stéatorrhée chez ces patients et, en particulier dans les cas de la mucoviscidose, par un ralentissement très sensible de la prise de poids chez les jeunes malades. Pour corriger cela on administre à ces sujets des extraits pancréatiques de porc au moment des repas. L'efficacité thérapeutique de ces extraits pourrait être nettement améliorée par la prescription de LPH (grâce à sa spécificité d'action sur les triglycérides à longues chaînes).

Les cellules de mammifères sont, a priori, plus adaptées à l'expression de gènes de mammifères. Leur utilisation pose cependant des problèmes de maturation des protéines. L'équipement enzymatique qui réalise la maturation post-traductionnelle est différent d'un tissu, d'un organe ou d'une espèce à l'autre. Par

exemple, il a été rapporté que la maturation post-traductionnelle d'une protéine plasmatique peut être différente lorsqu'elle est obtenue à partir du sang humain ou bien lorsqu'elle est produite par une cellule recombinante comme les cellules d'ovaires de hamster chinois ou dans le lait d'un animal transgénique. Par ailleurs, les faibles niveaux d'expression obtenus avec les cellules des mammifères impliquent la mise en oeuvre de cultures in vitro en très grands volumes à des coûts élevés. La production de protéines recombinantes dans le lait des animaux transgéniques (souris, brebis et vaches) permet de diminuer les coûts de production et de surmonter les problèmes de niveau d'expression. Cependant, il reste des problèmes d'éthique et de contaminations virales et subvirales (prions).

Pour ces raisons, la transgénèse de gènes de mammifères dans une cellule végétale pourrait offrir une voie de production en grandes quantités de protéines recombinantes nouvelles, à un coût de production réduit et sans risque de contaminations virales ou subvirales.

En 1983, plusieurs laboratoires ont découvert qu'il était possible de transférer un gène hétérologue dans le génome d'une cellule végétale et de régénérer des plantes transgéniques à partir de ces cellules génétiquement modifiées. Toutes les cellules de la plante possèdent alors le caractère génétiquement modifié qui est transmis à la descendance par fécondation sexuée.

Grâce à ces travaux, diverses équipes se sont intéressées à la production de protéines recombinantes de mammifères dans les cellules végétales ou dans des plantes transgéniques (Barta *et al.*, 1986). L'un des premiers résultats vraiment significatif dans ce domaine a été la production d'anticorps dans les plantes de tabac transgéniques.

Pour exprimer une protéine hétérologue dans la graine, lieu de stockage des protéines chez les végétaux, l'équipe de Vandekerckhove a fusionné la séquence codant pour la leu-enképhaline au gène codant pour l'albumine 2S d'*Arabidopsis thaliana*. Avec cette construction, des colza transgéniques ont été produits qui expriment spécifiquement la leu-enképhaline dans les graines à des niveaux d'expression de l'ordre de 0,1% des protéines totales. En 1990, le gène de la sérum albumine humaine a été transféré dans des cellules de tabac et de pomme de terre. Quelle que soit l'origine des peptides signaux (humaine ou végétale), des taux de sérum albumine humaine de l'ordre de 0,02% des protéines totales ont été obtenus dans les feuilles, les tiges et les tubercules de pomme de terre.

D'autres protéines recombinantes de mammifères ont été aussi produites dans les plantes: l'antigène de surface de l'hépatite B, les interférons, un anticorps de souris anti-*Streptococcus mutans*, agent de la carie, des fragments d'anticorps anti-

cellules cancéreuses, un anticorps anti-Herpès, la toxine du choléra et le facteur de croissance de l'épiderme humain (E.G.F).

L'ensemble de ces recherches a permis de montrer que la production de protéines recombinantes de mammifères dans les cellules végétales est possible et que les mécanismes de la synthèse des protéines à partir des séquences d'ADN sont similaires chez les cellules animales et les cellules végétales. De nombreuses différences existent néanmoins entre les cellules végétales et animales, notamment au niveau de la maturation des glycanes polymannosidiques en glycanes complexes, ou encore au niveau des sites de clivage des peptides signaux, ne permettant pas ainsi de garantir l'obtention de protéines de mammifères actives ou suffisamment actives par transformation de cellules végétales.

Les inventeurs ont découvert que l'utilisation de cellules végétales transformées par une séquence nucléotidique recombinante appropriée, permet d'obtenir de la lipase pancréatique, notamment de la LPH, recombinante ou des protéines ou polypeptides dérivés de ces dernières, présentant une activité enzymatique suffisante pour être développés dans une application industrielle.

Le but de la présente invention est de fournir un nouveau procédé d'obtention de lipases pancréatiques recombinantes de mammifères, et plus particulièrement de LPH, par les plantes, ou de protéines ou polypeptides dérivés de ces dernières, présentant une activité enzymatique, et plus particulièrement une activité lipasique, telle que lesdites lipases recombinantes, ou leurs polypeptides dérivés puissent être utilisés industriellement.

Un autre but de la présente invention est de fournir les outils pour la mise en oeuvre d'un tel procédé, notamment de nouvelles séquences nucléotidiques recombinantes, des cellules de plantes transformées génétiquement, des plantes ou parties de plantes (notamment feuilles, tiges, fruits, semences ou graines, racines) transformées génétiquement, et des fragments de ces plantes ou parties de plantes transformées génétiquement.

L'invention a également pour but de fournir de nouvelle(s) lipases pancréatiques recombinante(s) de mammifères, notamment la LPH, ou toute protéine ou polypeptide dérivé, enzymatiquement actifs et tels qu'obtenus à partir de cellules de plantes ou de plantes, transformées génétiquement.

L'invention a également pour but de fournir de nouvelles compositions enzymatiques susceptibles d'être utilisées dans le cadre de la mise en oeuvre de réactions enzymatiques, notamment à l'échelle industrielle.

L'invention a également pour but de fournir de nouvelles compositions pharmaceutiques, notamment dans le cadre du traitement de pathologies associées à un déficit de production de lipase dans l'organisme, telles que la mucoviscidose

ainsi que du traitement de pathologies associées à un désordre alimentaire, telle que l'obésité.

Un autre but de la présente invention est de fournir de nouveaux carburants, encore désignés biocarburants, présentant l'avantage d'être moins polluants que les carburants dérivés du pétrole, et d'être d'un coût de revient moins élevé.

#### DESCRIPTION DETAILLE DE L'INVENTION:

La présente invention a pour objet. l'utilisation d'une séquence nucléotidique recombinante contenant, d'une part, un ADNc codant pour une lipase pancréatique de mammifères ou pour une protéine ou un polypeptide dérivé, et d'autre part, les éléments permettant à une cellule végétale de produire la lipase pancréatique, ou la protéine ou le polypeptide dérivé, codé par ledit ADNc, notamment un promoteur et un terminateur de transcription reconnus par la machinerie transcriptionnelle des cellules végétales, pour la transformation de cellules de plantes en vue de l'obtention, à partir de ces cellules, ou de plantes obtenues à partir de ces dernières, d'une lipase pancréatique recombinante de mammifères, ou d'une protéine ou polypeptide dérivé.

En particulier, la présente invention a pour objet l'utilisation d'une séquence nucléotidique recombinante contenant, d'une part, un ADNc codant pour toute lipase pancréatique de mammifères ou pour une protéine ou un polypeptide dérivé, à savoir les protéines ou les polypeptides dont les séquences nucléotidiques codant pour ces dernières présentent *entre elles* un pourcentage d'homologie d'au moins environ 75%, notamment *d'au moins* environ 77% à environ 85%, et dont les séquences en acides aminés présentent *entre elles* un pourcentage d'homologie d'au moins environ 75%, notamment *d'au moins* environ 80% à environ 90%, et présentent une activité lipasique de type pancréatique. notamment un ADNc codant pour toute lipase pancréatique de mammifères, ou un ADNc codant pour toute protéine ou polypeptide dérivé des lipases pancréatiques susmentionnées par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un (ou plusieurs) acide(s) aminé(s), cette protéine ou ce polypeptide dérivé possédant une activité lipasique de type pancréatique, et, d'autre part, les éléments permettant à une cellule végétale de produire la lipase pancréatique, ou la protéine ou le polypeptide dérivé, codé par ledit ADNc, notamment un promoteur et un terminateur de transcription reconnus par la machinerie transcriptionnelle des cellules végétales, pour la transformation de cellules de plantes en vue de l'obtention, à partir de ces cellules, ou de plantes obtenues à partir de ces dernières, d'une lipase pancréatique recombinante de mammifères, ou d'une protéine ou polypeptide dérivé.

La présente invention a plus particulièrement pour objet l'utilisation d'une séquence nucléotidique recombinante contenant d'une part, l'ADNc codant pour la



LPH (Lowe M.E et al 1989), ou une séquence nucléotidique dérivée de cet ADNc, notamment par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un (ou plusieurs) nucléotide(s), ladite séquence dérivée étant susceptible de coder pour un polypeptide dont la séquence en acides aminés est identique à celle de la LPH, ou pour un polypeptide dérivé de la LPH par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un (ou plusieurs) acide(s) aminé(s), ce polypeptide dérivé présentant une activité lipase de type pancréatique, et d'autre part, les éléments permettant à une cellule végétale de produire le polypeptide codé par ledit ADNc ou par une séquence dérivée susmentionnée, notamment un promoteur et un terminateur de transcription reconnus par la machinerie transcriptionnelle des cellules végétales (et plus particulièrement par les ARN polymérases de ces dernières), pour la transformation de cellules de plantes en vue de l'obtention, à partir de ces cellules, ou des plantes obtenues à partir de ces dernières, de LPH recombinante sous forme d'enzyme active, ou d'un (ou plusieurs) polypeptide(s) dérivé(s) de cette dernière tel(s) que défini(s) ci-dessus.

L'invention concerne aussi une séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle contient d'une part la séquence codante pour une lipase pancréatique ou une protéine ou polypeptide dérivé et d'autre part, les éléments permettant à une cellule végétale de produire une lipase pancréatique pancréatique ou une protéine ou polypeptide dérivé codé par ladite séquence, notamment un promoteur et un terminateur de transcription reconnus par la machinerie transcriptionnelle des cellules végétales,

-une séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle contient d'une part la séquence codante pour une colipase ou une protéine ou polypeptide dérivé et d'autre part, les éléments permettant à une cellule végétale de produire une colipase pancréatique ou une protéine ou polypeptide dérivé codé par ladite séquence, notamment un promoteur et un terminateur de transcription reconnus par la machinerie transcriptionnelle des cellules végétales,

-et une séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle contient d'une part les séquences codantes pour une lipase pancréatique et une colipase ou les protéines ou polypeptides dérivés et d'autre part, les éléments permettant à une cellule végétale de produire une lipase pancréatique et une colipase ou les protéines ou polypeptides dérivés codés par ladite séquence, notamment un promoteur et un terminateur de transcription reconnus par la machinerie transcriptionnelle des cellules végétales.

L'invention concerne également toute séquence nucléotidique recombinante telle que décrite ci-dessus, notamment celle contenant à titre d'ADNc, celui de la

LPH ou une séquence nucléotidique dérivée de ce dernier telle que définie ci-dessus.

Avantageusement, les séquences nucléotidiques recombinantes selon l'invention contiennent une (ou plusieurs) séquence(s) codant pour un peptide responsable de l'adressage des polypeptides recombinants de l'invention (à savoir de la LPH recombinante ou des polypeptides dérivés susmentionnés) dans un compartiment déterminé de la cellule végétale, notamment dans le réticulum endoplasmique ou dans les vacuoles, ou bien même à l'extérieur de la cellule, dans la paroi pectocellulosique ou dans l'espace extracellulaire aussi appelé apoplasme.

Parmi les terminateurs de transcription susceptibles d'être utilisés pour la transformation de cellules de plantes dans le cadre de la présente invention, on peut citer le terminateur polyA 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV), ou le terminateur polyA NOS, qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline.

A ce titre, l'invention a pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que décrite ci-dessus contenant en aval dudit ADNc ou de sa séquence dérivée, le terminateur polyA 35S du CaMV, ou le terminateur polyA NOS d'*Agrobacterium tumefaciens*.

Parmi les promoteurs de transcription susceptibles d'être utilisés pour la transformation de cellules de plantes dans le cadre de la présente invention, on peut citer:

- le promoteur 35S (P35S), ou avantageusement le promoteur constitutif double 35S (Pd35S) du CaMV, ces promoteurs permettant l'expression des polypeptides recombinants de l'invention dans l'ensemble de la plante obtenue à partir de cellules transformées selon l'invention, et sont décrits dans l'article de Kay *et al.*, 1987,

- le promoteur PCRU du gène de la cruciférine de radis permettant l'expression des polypeptides recombinants de l'invention uniquement dans les semences (ou graines) de la plante obtenue à partir de cellules transformées selon l'invention, et décrit dans l'article de Depigny-This *et al.*, 1992,

- les promoteurs PGEA1 et PGEA6 correspondant à la région 5' non codante des gènes de la protéine de réserve de graines, GEA1 et GEA6, respectivement, d'*Arabidopsis thaliana* (Gaubier *et al.*, 1993), et permettant une expression spécifique dans les graines,

- le promoteur chimérique super-promoteur PSP (Ni M *et al.*, 1995), constitué de la fusion d'une triple répétition d'un élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de l'octopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*, d'un

élément activateur transcriptionnel du promoteur du gène de mannopine synthase et du promoteur mannopine synthase d'*Agrobacterium tumefaciens*,

- le promoteur actine du riz suivi de l'intron actine de riz (PAR-IAR) contenu dans le plasmide pAct1-F4 décrit par McElroy et al. (1991),

5       - le promoteur HMGW (*High Molecular Weight Glutenine*) d'orge (*Anderson O.D. et al, 1989*),

- le promoteur du gène de  $\gamma$ zéine de maïs (Pyzéine) contenu dans le plasmide py63 décrit dans Reina *et al.* (1990), et permettant l'expression dans l'albumen des semences de maïs.

10       A ce titre, l'invention a pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que décrite ci-dessus, contenant en amont dudit ADNc ou de sa séquence dérivée, le promoteur constitutif double 35S (Pd35S) du CaMV, ou le promoteur PCRU du gène de la cruciférine de radis, ou les promoteurs PGEA1 ou PGEA6 d'*Arabidopsis thaliana*, ou le super-promoteur PSP d'*Agrobacterium*  
15       *tumefaciens*, ou le promoteur PAR-IAR du riz, le promoteur HMGW d'orge ou le promoteur pyzéine du maïs.

Les séquences codant pour un peptide d'adressage utilisées dans le cadre de la présente invention, peuvent être d'origine végétale, humaine ou animale.

20       Parmi les séquences codant pour un peptide d'adressage d'origine végétale, on peut citer:

- la séquence nucléotidique de 69 nucléotides (indiquée dans les exemples qui suivent) codant pour le prépeptide (peptide signal) de 23 acides aminés de la sporamine A chez la patate douce, ce peptide signal permettant l'entrée des polypeptides recombinants de l'invention dans le système de sécrétion des cellules  
25       végétales transformées selon l'invention (à savoir principalement dans le réticulum endoplasmique),

- la séquence nucléotidique de 42 nucléotides (indiquée dans les exemples qui suivent) codant pour le propeptide N-terminal d'adressage vacuolaire de 14 acides aminés de la sporamine A chez la patate douce, permettant l'accumulation des polypeptides recombinants de l'invention dans les vacuoles des cellules végétales transformées selon l'invention,

30       - la séquence nucléotidique de 111 nucléotides (indiquée dans les exemples qui suivent) codant pour le prépropeptide de 37 acides aminés de la sporamine A constitué depuis l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale des 23 acides aminés du peptide signal susmentionné suivis par les 14 acides aminés du propeptide susmentionné, ce prépropeptide permettant l'entrée de polypeptides recombinants de l'invention dans le système de sécrétion et leur accumulation dans  
35       les vacuoles des cellules végétales transformées selon l'invention,

les trois séquences susmentionnées étant décrites dans les articles de Murakami *et al.*, 1986, et Matsuoka *et al.*, 1991,

- le propeptide carboxyterminal de la lectine d'orge décrit notamment dans les articles de Schroeder *et al.*, 1993, et de Bednarek *et al.*, 1991

5 - et le PRS (Pathogenesis Related Protein, Cornelissen *et al.* 1986) permettant la sécrétion.

Parmi les séquences codant pour un peptide d'adressage d'origine humaine ou animale, on peut citer celle codant pour le peptide signal de la lipase pancréatique humaine (LPH) tel que décrit dans Lowe M.E. *et al.* 1989, ou pour celui de la lipase gastrique de lapin (LGL) tel que décrit dans la demande de brevet européen EP 542629, dont la séquence est indiquée dans les exemples qui suivent, ou pour celui de la lipase gastrique de chien (LGC).

10 On peut également citer, parmi les séquences codant pour un peptide d'adressage, celle codant pour les peptides KDEL, SEKDEL et HDEL et permettant un adressage dans le réticulum endoplasmique.

15 A ce titre, l'invention a pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que décrite ci-dessus, contenant une séquence codant pour tout ou partie d'un peptide signal tel que celui de la sporamine A de la patate douce, ou celui de la LPH, ou de la LGL, ou de la LGC, cette séquence codant pour un peptide signal étant située, dans ladite séquence nucléotidique recombinante, en amont dudit ADNc ou de sa séquence dérivée et en aval du promoteur utilisé, de telle sorte que le dernier acide aminé C-terminal du peptide signal soit lié au premier acide aminé N-terminal du polypeptide codé par ledit ADNc ou sa séquence dérivée, dans la protéine codée par ladite séquence nucléotidique recombinante.

20 L'invention a également pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que décrite ci-dessus, contenant une séquence codant pour tout ou partie d'un peptide d'adressage vacuolaire, notamment celui de la sporamine A de la patate douce, cette séquence codant pour un peptide d'adressage vacuolaire étant située, dans ladite séquence nucléotidique recombinante, entre la séquence codant pour un peptide signal et celle codant pour ledit ADNc ou sa séquence dérivée, de telle sorte que le premier acide aminé N-terminal du peptide d'adressage vacuolaire soit lié au dernier acide aminé C-terminal du peptide signal, et que le dernier acide aminé C-terminal dudit peptide d'adressage soit lié au premier acide aminé N-terminal du polypeptide codé par ledit ADNc ou sa séquence dérivée, dans la protéine codée par ladite séquence nucléotidique recombinante.

L'invention a également pour objet toute séquence nucléotidique recombinante telle que décrite ci-dessus, contenant une séquence codant pour tout ou partie d'un peptide d'adressage vacuolaire, notamment celui de la lectine d'orge, cette séquence codant pour un peptide d'adressage vacuolaire étant située, dans  
5 ladite séquence nucléotidique recombinante, en aval de la séquence codant pour ledit ADNc ou sa séquence dérivée, de telle sorte que le premier acide aminé N-terminal du peptide d'adressage vacuolaire soit lié au dernier acide aminé C-terminal du polypeptide codé par ledit ADNc ou sa séquence dérivée, dans la protéine codée par ladite séquence nucléotidique recombinante.

10 L'invention a plus particulièrement pour objet les séquences nucléotidiques recombinantes suivantes:

- celle (désignée Pd35S-PS-LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur Pd35S du CaMV, la séquence codant pour le peptide signal de la sporamine A, cette dernière étant immédiatement suivie par la séquence  
15 nucléotidique codant pour la LPH mature, puis le terminateur polyA 35S du CaMV,

- celle (désignée Pd35S-PPS- LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur Pd35S du CaMV, la séquence codant pour le prépropeptide de la sporamine A, cette dernière étant immédiatement suivie par la séquence  
20 nucléotidique codant pour la LPH mature, puis le terminateur polyA 35S du CaMV,

- celle (désignée Pd35S-PSLPH- LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur Pd35S du CaMV, la séquence codant pour le peptide signal de la LPH (ou PSLPH) (à savoir pour une séquence constituée des 16 acides aminés décrits  
25 dans Lowe M.E. et al. 1989), cette dernière étant immédiatement suivie par la séquence nucléotidique codant pour la LPH mature, puis le terminateur polyA 35S du CaMV,

- celle (désignée Pd35S-PSLGL- LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur Pd35S du CaMV, la séquence codant pour le peptide signal de la lipase  
30 gastrique de lapin (ou PSLGL), cette dernière étant immédiatement suivie par la séquence nucléotidique codant pour la LPH mature, puis le terminateur polyA 35S du CaMV,

- celle (désignée Pd35S-PRS- LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur Pd35S du CaMV, la séquence codant pour le peptide signal de la  
35 Pathogenesis Related Protein, cette dernière étant immédiatement suivie par la séquence nucléotidique codant pour la LPH mature, puis le terminateur polyA 35S du CaMV,

- celle (désignée PCRU-PS- LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur PCRU de la cruciférine, la séquence codant pour le peptide signal de la sporamine A, cette dernière étant immédiatement suivie par la séquence nucléotidique codant pour la LPH mature, puis le terminateur polyA 35S du CaMV,

- celle (désignée PCRU-PPS- LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur PCRU de la cruciférine, la séquence codant pour le prépropeptide de la sporamine A, cette dernière étant immédiatement suivie par la séquence nucléotidique codant pour la LPH mature, puis le terminateur polyA 35S du CaMV,

- celle (désignée PCRU- PSLPH - LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur PCRU de la cruciférine, la séquence codant le peptide signal de la LPH (telle que décrit ci-dessus), cette dernière étant immédiatement suivie par l'ADNc codant pour la LPH mature puis le terminateur polyA 35S du CaMV,

- celle (désignée PCRU- PSLGL - LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur PCRU de la cruciférine, la séquence codant le peptide signal de la LGL (telle que décrit ci-dessus), cette dernière étant immédiatement suivie par l'ADNc codant pour la LPH mature puis le terminateur polyA 35S du CaMV,

- celle (désignée PCRU- PRS- LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur PCRU de la cruciférine, la séquence codant le peptide signal de Pathogenesis Related Protein, cette dernière étant immédiatement suivie par l'ADNc codant pour la LPH mature puis le terminateur polyA 35S du CaMV,

- celle (désignée PGEA1- PSLPH - LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur PGEA1 d'*Arabidopsis thaliana*, la séquence codant le peptide signal de la LPH (telle que décrit ci-dessus), cette dernière étant immédiatement suivie par l'ADNc codant pour la LPH mature, puis le terminateur polyA 35S du CaMV,

- celle (désignée PGEA1- PSLGL - LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur PGEA1 d'*Arabidopsis thaliana*, la séquence codant le peptide signal de la LGL (telle que décrit ci-dessus), cette dernière étant immédiatement suivie par l'ADNc codant pour la LPH mature, puis le terminateur polyA 35S du CaMV,

- celle (désignée PGEA6- PSLPH - LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur PGEA6 d'*Arabidopsis thaliana*, la séquence codant le peptide signal de la LPH, cette dernière étant immédiatement suivie par codant pour la LPH mature ou son précurseur, puis le terminateur polyA 35S du CaMV,

- celle (désignée PGEA6- PSLGL - LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur PGEA1 d'*Arabidopsis thaliana*, la séquence codant le peptide signal de la LGL (telle que décrit ci-dessus), cette dernière étant immédiatement suivie par l'ADNc codant pour la LPH mature, puis le terminateur polyA 35S du CaMV,

- celle (désignée PAR-IAR- PSLPH - LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur PAR-IAR du riz, la séquence codant pour le peptide signal de la LPH (telle que décrite ci-dessus), cette dernière étant immédiatement suivie par l'ADNc codant pour la LPH mature, puis le terminateur polyA 35S du CaMV, ou le

- celle (désignée PAR-IAR- PSLGL - LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur PAR-IAR du riz, la séquence codant pour le peptide signal de la LGL (telle que décrite ci-dessus), cette dernière étant immédiatement suivie par l'ADNc codant pour la LPH mature, puis le terminateur polyA 35S du CaMV, ou le

- celle (désignée Pyzéine- PSLPH - LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur pyzéine du maïs, la séquence codant pour le peptide signal de la LPH (telle que décrit ci-dessus), cette dernière étant immédiatement suivie par l'ADNc codant pour la LPH mature, ou son précurseur, puis le terminateur polyA 35S du CaMV,

- celle (désignée Pyzéine- PSLGL - LPH) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur pyzéine du maïs, la séquence codant pour le peptide signal de la LGL (telle que décrite ci-dessus), cette dernière étant immédiatement suivie par l'ADNc codant pour la LPH mature, ou son précurseur, puis le terminateur polyA 35S du CaMV,

- celle (désignée Pyzéine- PSLPH - LPH -KDEL) contenant dans le sens 5' → 3' le promoteur pyzéine du maïs, la séquence codant pour le peptide signal de la LPH (telle que décrit ci-dessus), cette dernière étant immédiatement suivie par l'ADNc codant pour la LPH mature puis la séquence codant pour le térapeptide KDEL, puis le terminateur polyA 35S du CaMV.

Avantageusement, les séquences nucléotidiques recombinantes de l'invention contiennent également une séquence nucléotidique utilisable en tant que marqueur desdites séquences recombinantes, notamment pour différencier (et ainsi sélectionner) celles des cellules de plantes qui sont transformées par lesdites séquences recombinantes de celles qui ne le sont pas.

De préférence, une telle séquence nucléotidique utilisable en tant que marqueur desdites séquences recombinantes, est choisie parmi les gènes de résistance aux antibiotiques, notamment le gène de résistance à la kanamycine.

L'invention a également pour objet tout vecteur, notamment plasmidique, contenant une séquence nucléotidique recombinante selon l'invention, insérée en un site non essentiel pour sa répllication.

L'invention concerne également tout hôte cellulaire, notamment toute bactérie telle que *Agrobacterium tumefaciens*, transformé par un vecteur tel que défini ci-dessus.

L'invention concerne aussi un procédé d'obtention de lipase pancréatique recombinante, ou d'une protéine ou un polypeptide dérivé, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la transformation de cellules végétales, notamment à l'aide d'un hôte cellulaire selon l'invention, lui-même transformé par un vecteur l'invention, de manière à intégrer dans le génome de ces cellules une séquence recombinante selon l'invention

- le cas échéant, l'obtention de plantes transformées à partir des cellules transformées susmentionnées,

- la récupération de la lipase pancréatique recombinante ou de la protéine ou polypeptide dérivé produit dans lesdites cellules ou plantes transformées susmentionnées, notamment par extraction, suivie, le cas échéant, par une purification.

Par exemple, la présente invention a pour objet tout procédé d'obtention d'une lipase pancréatique humaine, recombinante sous forme d'enzyme active, et/ou d'un (ou plusieurs) polypeptide(s) dérivé(s) de cette dernière, notamment par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un (ou plusieurs) acide(s) aminé(s), ce (ou ces) polypeptide(s) dérivé(s) présentant une activité lipasique, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la transformation de cellules végétales, de manière à intégrer, dans le génome de ces cellules, une (ou plusieurs) séquence(s) nucléotidique(s) recombinante(s) selon l'invention,

- le cas échéant, l'obtention de plantes transformées à partir des cellules transformées susmentionnées,

- la récupération de la lipase pancréatique humaine recombinante et/ou du (ou des) polypeptide(s) dérivé(s) susmentionné(s) produit(s) dans lesdites cellules ou plantes transformées susmentionnées, notamment par extraction, suivie, le cas échéant, par une purification.

Selon un mode de réalisation du procédé susmentionné de l'invention, la transformation de cellules végétales peut être réalisée par transfert de la séquence nucléotidique recombinante de l'invention dans les protoplastes, notamment après incubation de ces derniers dans une solution de polyéthylène glycol (PEG) en présence de cations divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par électroporation.



La transformation des cellules végétales peut également être réalisée par utilisation d'un canon à gène permettant la projection, à très grande vitesse, de particules métalliques recouvertes de séquences nucléotidiques recombinantes selon l'invention, délivrant ainsi des gènes à l'intérieur du noyau cellulaire.

5 Une autre méthode de transformation des cellules végétales, est celle de la micro-injection cytoplasmique ou nucléaire.

Selon un mode de réalisation particulièrement préféré du procédé susmentionné de l'invention, les cellules végétales sont transformées par mise en présence de ces dernières avec un hôte cellulaire transformé par un vecteur selon l'invention, tel que décrit ci-dessus, ledit hôte cellulaire étant susceptible d'infecter lesdites cellules végétales en permettant l'intégration dans le génome de ces dernières, des séquences nucléotidiques recombinantes de l'invention initialement contenues dans le génome du vecteur susmentionné.

15 Avantageusement, l'hôte cellulaire susmentionné utilisé est *Agrobacterium tumefaciens*, notamment selon les méthodes décrites dans les articles de Bevan, 1984 et d'An *et al.*, 1986, ou encore *Agrobacterium rhizogenes*, notamment selon la méthode décrite dans l'article de Jouanin *et al.*, 1987.

20 Parmi les cellules végétales susceptibles d'être transformées dans le cadre de la présente invention, on peut citer celles du colza, tabac, maïs, pois, tomate, carotte, blé, orge, pomme de terre, soja, tournesol, laitue, riz et luzerne.

Selon un mode de réalisation du procédé susmentionné de l'invention, les cellules végétales transformées selon l'invention, sont cultivées *in vitro*, notamment en bioréacteurs, en milieu liquide, ou sous forme immobilisées, ou encore par culture de racines transformées *in vitro*.

25 Les milieux des cultures *in vitro* susmentionnés sont ensuite récupérés pour en extraire, et le cas échéant purifier, notamment par chromatographie, la lipase pancréatique, notamment la LPH, recombinante et/ou les protéines ou polypeptide(s) dérivé(s) définis ci-dessus, produits par lesdites cellules transformées cultivées *in vitro*.

30 Selon un mode de réalisation préféré du procédé susmentionné d'obtention de la lipase pancréatique, notamment de la LPH, recombinante et/ou des protéines ou polypeptide(s) dérivé(s) selon l'invention, la transformation de cellules végétales est suivie par une étape d'obtention de plantes transformées par mise en culture desdites cellules transformées dans un milieu approprié. La lipase pancréatique, 35 notamment la LPH, recombinante et/ou le (ou les) protéines ou polypeptide(s) dérivé(s), produit(s) dans les cellules des plantes entières ainsi obtenues, sont récupérés par extraction réalisée à partir des plantes entières, ou de parties de ces plantes (notamment à partir des feuilles ou des tiges ou des fruits), ou encore à

partir de semences issues de ces plantes, cette extraction étant le cas échéant suivie par une étape de purification de la lipase pancréatique, notamment de la LPH, recombinante et/ou de la protéine ou du (ou des) polypeptide(s) dérivé(s).

Les plantes transformées utilisées pour la récupération de la lipase pancréatique, notamment de la LPH, recombinante et/ou de la (ou des) protéine (s) ou polypeptide(s) dérivé(s) dans le cadre du procédé susmentionné, sont celles de la génération T<sub>0</sub>, à savoir celles obtenues à partir de culture de cellules transformées de l'invention sur un milieu approprié, ou avantageusement celles des générations suivantes (T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub> etc.) obtenues, par exemple par autofécondation des plantes de la génération précédente et dans lesquelles les séquences nucléotidiques recombinantes de l'invention se reproduisent selon les lois de Mendel.

L'invention vise plus particulièrement un procédé d'obtention tel que décrit ci-dessus de la LPH recombinante, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la transformation de cellules d'explants de feuilles d'une plante, par mise en présence de ces dernières avec une souche d'*Agrobacterium tumefaciens* transformée par un plasmide tel que décrit ci-dessus contenant la séquence nucléotidique recombinante choisie dans la liste suivante : Pd35S-PS-LPH, Pd35S-PPS-LPH, Pd35S-PSLGL-LPH et Pd35S-PSLPH- LPH susmentionnée, sur un milieu de culture approprié,

- sélection des explants transformés sur un milieu contenant de la kanamycine,

- obtention de plantes transformées à partir des explants transformés susmentionnés par culture de ces derniers sur des milieux appropriés,

- extraction de la LPH recombinante notamment par broyage des feuilles et/ou des graines et/ou des fruits des plantes transformées susmentionnées dans un tampon approprié, centrifugation et récupération du surnageant constituant l'extrait végétal à activité enzymatique,

- le cas échéant purification de la LPH recombinante à partir de l'extrait obtenu lors de l'étape précédente, notamment par chromatographie réalisée à partir du surnageant, ce qui conduit à l'obtention de LPH recombinante sous forme essentiellement pure.

Les cellules végétales transformées dans les procédés décrits ci-dessus sont avantageusement choisies parmi celles de tabac, colza, maïs, pois, tomate, carotte, blé, orge, pomme de terre, soja, tournesol, laitue, riz et luzerne.

L'invention vise plus particulièrement un procédé d'obtention de LPH recombinante, caractérisé en ce qu'il comprend:

- la transformation de cellules de cals de maïs, par bombardement de ces dernières à l'aide d'un canon à particules, avec des plasmides contenant la séquence

nucléotidique recombinante PAR-IAR-PSLPH- LPH et/ou la séquence pyzéine-PSLGL- LPH et/ou la séquence Pyzéine- PSLPH -LPH-KDEL,

- sélection des cals transformés sur un milieu contenant un agent sélectif tel que la kanamycine,

5 - obtention de plantes de maïs transformées à partir des cals transformés susmentionnés par culture de ces derniers sur des milieux appropriés,

- extraction de la LPH recombinante, notamment par broyage, dans un tampon approprié, des semences issues des plantes transformées susmentionnées, centrifugation et récupération du surnageant constituant l'extrait végétal à activité enzymatique,

10 - le cas échéant, purification de la LPH à partir de l'extrait obtenu lors de l'étape précédente, notamment par chromatographie réalisée à partir du surnageant, ce qui conduit à l'obtention de la LPH sous forme essentiellement pure.

L'invention a également pour objet toute cellule végétale transformée génétiquement, contenant une (ou plusieurs) séquence(s) nucléotidique(s) recombinante(s) selon l'invention, intégrée(s) de façon stable dans leur génome.

L'invention concerne également toute cellule végétale transgénique telle que décrite ci-dessus, contenant une (ou plusieurs) protéine(s) ou polypeptide(s) recombinant(s) selon l'invention, tels que la LPH, ladite cellule végétale étant encore désignée cellule végétale à activité enzymatique, et plus particulièrement à activité lipasique telle que définie ci-après.

20 L'invention a également pour objet des semences transformées génétiquement contenant une (ou plusieurs) séquence(s) nucléotidique(s) recombinante(s) telle(s) que décrite(s) ci-dessus, selon l'invention, intégrée(s) de façon stable dans leur génome.

25 L'invention concerne également les semences transgéniques décrites ci-dessus, et contenant une (ou plusieurs) protéine(s) ou polypeptide(s) recombinant(s) selon l'invention, tels que la LPH *recombinante*, lesdites semences étant encore désignées semences à activité enzymatique, et plus particulièrement à activité telle que définie ci-après.

30 Les semences transformées selon l'invention sont celles récoltées à partir de plantes transformées génétiquement selon l'invention, ces plantes transformées étant soit celles de la génération T0 susmentionnée et obtenues par mise en culture de cellules transformées selon l'invention, soit celles des générations suivantes (T1, T2 etc...) obtenues par exemple par autofécondation ou par croisement des plantes des générations précédentes (comme indiqué ci-dessus).

35 L'invention a également pour objet les plantes ou parties de plantes (notamment explants, tiges, feuilles, fruits, racines, semences, pollen, etc...)

transformé(e)s génétiquement, caractérisé(e)s en ce qu'elles (ils) contiennent une (ou plusieurs) séquence(s) nucléotidique(s) recombinante(s) selon l'invention, intégrée(s) de façon stable dans leur génome.

L'invention concerne également les plantes ou parties de plantes transgéniques décrits ci-dessus, contenant une (ou plusieurs) protéine(s) ou polypeptide(s) recombinant(s) selon l'invention, tels que la LPH, lesdit(e)s plantes ou parties de plantes étant encore désigné(e)s plantes ou parties de plantes à activité enzymatique, et plus particulièrement à activité lipasique telle que définie ci-après.

L'invention a plus particulièrement pour objet, les plantes transformées susmentionnées, telles qu'obtenues par mise en culture de cellules ou de semences telles que décrites ci-dessus, selon l'invention.

Les plantes, ou parties de plantes, transformées selon l'invention sont avantageusement choisis parmi le colza, le tabac, le maïs, le pois, la tomate, la carotte, le blé, l'orge, la pomme de terre, le soja, le tournesol, le riz, la laitue, la luzerne et la betterave, ou les parties de ces plantes.

La présente invention a pour objet tout extrait végétal à activité enzymatique, et par exemple à activité lipasique définie ci-après, tel qu'obtenu par mise en oeuvre de l'un des procédés décrits ci-dessus de l'invention, contenant de la lipase pancréatique recombinante et/ou de la colipase recombinante ou les protéines ou polypeptides dérivés.

L'activité lipasique (ou lipolytique) des plantes ou parties de plantes, et des extraits végétaux à activité enzymatique de l'invention, peut être mesurée notamment selon la méthode de Duan R. et al. 1991 utilisant un triglycéride à chaîne courte (tel que la tributyrine) comme substrat ou par la méthode de Egloff M.P. et al. 1995. L'activité enzymatique est rapportée en unités U, une unité U correspondant à la quantité d'enzyme nécessaire pour libérer une  $\mu$ mole d'acides gras libres par minute à 37°C dans les conditions optimales de pH.

Les extraits végétaux à activité enzymatique de l'invention sont avantageusement tels que le pourcentage en poids de polypeptides recombinants enzymatiquement actifs, représente environ 0,1% à 20%, notamment environ 1% à environ 15%, par rapport au poids total de protéines présentes dans ces extraits.

L'invention a plus particulièrement pour objet les extraits végétaux à activité enzymatique suivants:

- les extraits de feuilles et/ou de fruits et/ou de graines de plantes, tels qu'obtenus par transformation des cellules d'explants de ces plantes avec la séquence Pd35S-PSLPH- LPH, ou la séquence Pd35S-PS- LPH, ou la séquence

Pd35S-PPS- LPH, ou la séquence Pd35S-PSLGL- LPH, selon l'un des procédés décrits ci-dessus, et contenant la LPH recombinante.

- l'extrait de feuilles de tabac, tel qu'obtenu par transformation de cellules d'explants de feuilles de tabac avec la séquence Pd35S-PS- LPH, ou la séquence Pd35S-PPS- LPH, selon le procédé décrit ci-dessus,

- l'extrait de feuilles de tabac, tel qu'obtenu par transformation de cellules d'explants de feuilles de tabac avec la séquence Pd35S-PSLGL- LPH ou la séquence Pd35S-PSLPH- LPH, selon le procédé décrit ci-dessus,

- l'extrait de graines de tabac, tel qu'obtenu par transformation de cellules d'explants de feuilles de tabac avec la séquence Pd35S-PS-LPH, ou la séquence Pd35S-PPS-LPH, selon le procédé décrit ci-dessus,

- les extraits de graines de plantes tels qu'obtenus par transformation de cellules d'explants de ces plantes avec la séquence PCRU-PS- LPH, ou la séquence PCRU-PPS-LPH, ou la séquence PGEA1-PSLGL- LPH, ou la séquence PGEA6-PSLPH - LPH, selon l'un des procédés décrits ci-dessus, et contenant la LPH recombinante:

- l'extrait de graines de colza, tel qu'obtenu par transformation de cellules d'explants de feuilles de colza avec la séquence PCRU-PS-LPH, ou la séquence PCRU-PPS-LPH, ou la séquence PGEA1- PSLPH -LPH, ou la séquence PGEA6-PSLPH -LPH, selon le procédé décrit ci-dessus,

- les extraits de semences de plantes tels qu'obtenus par transformation de cellules d'explants de ces plantes avec la séquence PAR-IAR- PSLPH -LPH et/ou la séquence Pyzéine- PSLPH -LPH et/ou la séquence Pyzéine- PSLPH -LPH-KDEL, selon l'un des procédés décrits ci-dessus, et contenant la LPH recombinante

- l'extrait de semences de maïs, tel qu'obtenu par transformation de cellules de maïs (notamment de cals de maïs) avec la séquence PAR-IAR- PSLPH -LPH et/ou la séquence Pyzéine-PSLGL-LPH et/ou la séquence Pyzéine- PSLPH -LPH-KDEL, selon le procédé décrit ci-dessus.

La présente invention a pour objet une lipase pancréatique recombinante ou protéine ou polypeptide dérivé caractérisé en ce qu'elle est obtenue selon le procédé selon l'invention.

La présente invention a notamment pour objet toute lipase pancréatique recombinante enzymatiquement active, notamment la LPH, ou protéines ou polypeptides dérivés, notamment par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un (ou plusieurs) acide(s) aminé(s), ces polypeptides dérivés présentant une activité lipasique, tels qu'obtenus sous forme essentiellement pure par mise en oeuvre d'un des procédés décrits ci-dessus de l'invention, ces procédés comprenant

une étape de purification des polypeptides recombinants de l'invention, notamment par chromatographie réalisée à partir des extraits enzymatiques décrits ci-dessus.

Par lipase pancréatique recombinante enzymatiquement active, ou polypeptides dérivés présentant une activité lipasique, selon l'invention, on entend tout polypeptide recombinant susceptible de présenter une activité lipasique de type pancréatique par exemple telle que mesurée selon la méthode de Duan ou la méthode de Egloff.

L'invention concerne plus particulièrement la LPH recombinante telle qu'obtenue par purification de l'extrait enzymatique de feuilles ou de graines de tabac, ces feuilles ou graines provenant de plantes de tabac transformées, elles-mêmes obtenues à partir de cellules de tabac transformées avec la séquence Pd35S-PSLGL-LPH ou séquence Pd35S-PSLPH-LPH selon le procédé décrit ci-dessus, ladite LPH recombinante présentant une activité lipasique telle que décrite ci-dessus.

L'invention concerne les anticorps dirigés contre les polypeptides recombinants de l'invention, et plus particulièrement ceux dirigés contre la LPH recombinante selon l'invention.

De tels anticorps peuvent être obtenus par immunisation d'un animal avec ces polypeptides suivie de la récupération des anticorps formés.

Il va de soi que cette production n'est pas limitée aux anticorps polyclonaux.

Elle s'applique encore à tout anticorps monoclonal produit par tout hybridome susceptible d'être formé, par des méthodes classiques, à partir des cellules spléniques d'un animal, notamment de souris ou de rat, immunisés contre l'un des polypeptides purifiés de l'invention d'une part, et des cellules d'un myélome approprié d'autre part, et d'être sélectionné, par sa capacité à produire des anticorps monoclonaux reconnaissant le polypeptide susmentionné initialement mis en oeuvre pour l'immunisation des animaux.

L'invention concerne également l'utilisation de plantes, parties de plantes, cellules de plantes, ou semences transformés selon l'invention, pour l'obtention d'une (ou plusieurs) protéines ou polypeptide(s) recombinant(s) selon l'invention, tels que la LPH recombinante, ou ses polypeptides dérivés tels que définis ci-dessus, notamment par mise en oeuvre d'un des procédés susmentionnés de l'invention, lesdits polypeptides recombinants étant sous forme essentiellement pure ou contenus dans des extraits végétaux à activité enzymatique tels que définis ci-dessus.

L'invention concerne notamment :

-l'utilisation de plantes, ou parties de plantes selon l'invention et/ou des extraits de plantes selon l'invention, et/ou de protéines ou de polypeptides ou

d'association de ceux-ci selon l'invention, pour l'obtention de médicaments destinés au traitement de pathologies associées à un déficit de production de lipase dans l'organisme, telles que la mucoviscidose ou dans le cadre du traitement de désordre alimentaire, telle que l'obésité,

5            -l'utilisation de plantes, *ou parties* de plantes selon l'invention, et/ou des extraits de plantes selon l'invention, et/ou de protéines ou de polypeptides ou d'association de ceux-ci selon l'invention, pour l'obtention d'aliments *destinés à l'alimentation humaine ou animale*, notamment d'aliments fonctionnels plus particulièrement destinés à faciliter l'absorption des graisses animales ou végétales  
10           ingérées par un individu sain ou atteint d'une ou plusieurs pathologies affectant ou non le taux de production de lipase gastrique et/ou pancréatique,

             -et l'utilisation de plantes, *ou parties* de plantes selon l'invention, et/ou des extraits de plantes selon l'invention, et/ou de protéines ou de polypeptides ou d'association de ceux-ci selon l'invention, pour la mise en oeuvre de réactions  
15           enzymatiques dans le domaine industriel, agro-alimentaire ou agro-industrielle, notamment dans l'industrie des corps gras, de la lipochimie et l'industrie laitière.

             L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation en tant qu'aliments des plantes, ou parties de plantes, notamment des feuilles, des fruits, des semences à activité enzymatique selon l'invention.

20           A ce titre l'invention a plus particulièrement pour objet tout aliment fonctionnel constitué d'une plante à activité enzymatique telle que décrite ci-dessus, ou de parties de cette plante, notamment de feuilles ou fruits ou encore de semences issues de cette dernière, et susceptible(s) de présenter un caractère comestible chez l'Homme, ou l'animal.

25           L'invention vise également tout aliment fonctionnel contenant une (ou plusieurs) plante(s) à activité enzymatique telle(s) que décrite(s) ci-dessus, et/ou des parties de cette (ces) plante(s), notamment des feuilles et/ou des semences et/ou des fruits de cette (ces) plante(s), et/ou un (ou plusieurs) extrait(s) végétal (végétaux) à activité enzymatique tel(s) que décrit(s) ci-dessus, et/ou une (ou  
30           plusieurs) protéines ou polypeptide(s) recombinant(s) de l'invention, le cas échéant en association avec un (ou plusieurs) autre(s) composé(s) comestible(s).

             Par exemple, l'invention a plus particulièrement pour objet toute composition alimentaire susmentionnée contenant de la LPH recombinante obtenue selon  
35           l'invention sous forme essentiellement pure ou partiellement pure ou sous forme de plantes et/ou d'extraits enzymatiques tels que décrits ci-dessus éventuellement associée à une ou plusieurs autres activités enzymatiques utiles pour la digestion, de préférence une activité enzymatique de type amylase, protéase (notamment trypsine et chymotrypsine et/ou élastase).

Avantageusement, les plantes ou parties de plantes, contenus dans la composition alimentaire susmentionnée, se présentent sous forme de broyats.

Les aliments selon l'invention, encore désignés aliments fonctionnels, ou les compositions alimentaires selon l'invention sont plus particulièrement destinés à faciliter l'absorption des graisses animales ou végétales ingérées par un individu sain ou atteint d'une ou plusieurs pathologies affectant ou non le taux de production de lipase gastrique et/ou pancréatique. A ce titre, les aliments ou compositions alimentaires de l'invention, sont avantageusement utilisés en tant que compléments nutritionnels.

L'invention a également pour objet l'utilisation de plantes, ou de parties de plantes, notamment de feuilles et/ou fruits et/ou semences, ou de cellules végétales à activité enzymatique selon l'invention, ou d'extraits végétaux à activité enzymatique tels que définis ci-dessus, ou encore de polypeptides recombinants selon l'invention, tels que la LPH recombinante, ou ses polypeptides dérivés tels que définis ci-dessus, pour l'obtention de médicaments (ou compositions pharmaceutiques) destinés à faciliter l'absorption des graisses animales ou végétales ingérées par un individu sain ou atteint d'une ou plusieurs pathologies affectant ou non le taux de production de lipase gastrique et/ou pancréatique ou à corriger un désordre alimentaire, notamment l'obésité.

Notamment, de telles compositions pharmaceutiques sont avantageusement utilisées chez les individus subissant un traitement médical altérant le mécanisme d'absorption des graisses, ou encore chez les personnes âgées.

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont aussi plus particulièrement destinées au traitement des pathologies liées à l'insuffisance de lipases (notamment de lipase(s) gastrique et/ou pancréatique) dans l'organisme, et plus particulièrement de pathologies telles que la mucoviscidose, l'insuffisance pancréatique exocrine, et l'obésité.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend des plantes, *ou parties* de plantes selon l'invention, et/ou des extraits de plantes selon l'invention, et/ou de protéines ou de polypeptides ou d'association de ceux-ci selon l'invention, le cas échéant en association avec un ou plusieurs véhicules ou excipients pharmaceutiquement acceptables.

L'invention a plus particulièrement pour objet toute composition pharmaceutique susmentionnée contenant de la LPH recombinante sous forme essentiellement pure ou sous forme d'extraits enzymatiques tels que décrits ci-dessus.



Par exemple, l'invention a plus particulièrement pour objet toute composition pharmaceutique susmentionnée contenant de la LPH recombinante sous forme essentiellement pure ou partiellement pure ou sous forme d'extraits enzymatiques tels que décrits ci-dessus associée à une ou plusieurs autres activités enzymatiques utiles pour la digestion, de préférence une activité enzymatique de type amylase, protéase (notamment trypsine et chymotrypsine et/ou élastase).

Les compositions pharmaceutiques selon l'invention sont de préférence administrables par voie orale, et se présentent notamment sous forme de gélules, de comprimés ou de poudres à diluer.

La posologie journalière chez l'homme est avantageusement d'environ 200 mg à environ 1000 mg, répartis de préférence au moment des repas principaux, lorsque lesdites compositions pharmaceutiques contiennent des extraits enzymatiques tels que décrits ci-dessus, et d'environ 100 mg à environ 500 mg, lorsque lesdites compositions pharmaceutiques contiennent des polypeptides recombinants selon l'invention sous forme essentiellement pure.

L'invention a également pour objet l'utilisation de plantes, ou de parties de plantes, notamment de feuilles et/ou fruits et/ou semences, ou de cellules végétales à activité enzymatique selon l'invention, ou d'extraits végétaux à activité enzymatique tels que définis ci-dessus, ou encore de polypeptides recombinants selon l'invention, tels que la LPH recombinante, ou ses polypeptides dérivés tels que définis ci-dessus, pour la mise en oeuvre de réactions enzymatiques dans le domaine industriel, agro-alimentaire ou agro-industriel, notamment dans l'industrie des corps gras, de la lipochimie et l'industrie laitière.

A ce titre, l'invention concerne tout procédé, notamment de bioconversion enzymatique, ou de biocatalyse, par mise en oeuvre d'une ou plusieurs réactions enzymatiques dans le domaine industriel, agro-alimentaire ou agro-industriel, notamment dans l'industrie des corps gras, de la lipochimie et l'industrie laitière, ces réactions enzymatiques étant effectuées au moyen de plantes, ou de parties de plantes, notamment de feuilles et/ou fruits et/ou semences, ou de cellules végétales à activité enzymatique selon l'invention, ou d'extraits végétaux à activité enzymatique tels que définis ci-dessus, ou encore de polypeptides recombinants selon l'invention, tels que la LPH recombinante, ou ses polypeptides dérivés tels que définis ci-dessus.

L'invention a plus particulièrement pour objet des préparations enzymatiques à destination industrielle, agro-alimentaire ou agro-industrielle, susceptibles d'être utilisées dans le cadre de la mise en oeuvre d'un procédé tel que décrit ci-dessus, et comprenant des plantes, *ou parties* de plantes selon l'invention, et/ou des extraits de plantes selon l'invention, et/ou de protéines ou de polypeptides ou d'association

de ceux-ci selon l'invention le cas échéant en association avec un (ou plusieurs) additif(s) ou autre(s) enzyme(s) susceptible(s) d'être utilisé(s) dans le cadre de l'application industrielle susmentionnée.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation de plantes, ou de parties de plantes, notamment de feuilles et/ou fruits et/ou semences, ou de cellules végétales à activité enzymatique selon l'invention, pour la mise en oeuvre, à l'échelle industrielle, de réactions de bioconversions enzymatiques, ou de biocatalyses, telles que hydrolyses, ou trans-estérifications enzymatiques.

Avantageusement, les plantes à activité enzymatique, ou parties de ces plantes, notamment les feuilles et/ou fruits et/ou semences, ou de cellules végétales, selon l'invention, sont utilisées à la fois en tant que source enzymatique et substrat réactionnel.

L'invention a également pour objet tout procédé de biocatalyse utilisant des plantes, ou parties de plantes, notamment des feuilles et/ou fruits et/ou *semences*, ou de *cellules végétales* à activité enzymatique selon l'invention, et plus particulièrement des plantes contenant la LPH, lesdites plantes, ou parties de plantes, étant utilisées à la fois en tant que source enzymatique et substrat réactionnel.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation des plantes à activité enzymatique, ou de parties de ces plantes, selon l'invention, pour l'obtention de biocarburants.

A ce titre, la présente invention a pour objet tout procédé d'obtention de biocarburant par addition d'alcool, notamment de méthanol ou d'éthanol, à un broyat de tout ou partie de plantes transformées selon l'invention, avantageusement à un broyat de graines de colza, de tournesol ou de soja, transformées selon l'invention, et récupération de biocarburant, notamment par filtration.

L'invention concerne également les esters d'acides gras végétaux tels qu'obtenus par mise en oeuvre du procédé susmentionné, notamment le méthyl ester d'acide oléique.

L'invention a également pour objet tout biocarburant tel qu'obtenu par mise en oeuvre d'un procédé tel que décrit ci-dessus, et plus particulièrement tout biocarburant susmentionné comprenant des esters d'acides gras végétaux.

L'invention vise plus particulièrement tout biocarburant tel qu'obtenu par mise en oeuvre du procédé susmentionné à partir de graines de colza, et comprenant un méthylester d'acide oléique.

L'invention vise également l'utilisation des anticorps susmentionnés dirigés contre les polypeptides recombinants de l'invention, pour la mise en oeuvre d'une

méthode de détection ou de dosage de la LPH dans un échantillon biologique susceptible de la contenir.

L'invention concerne plus particulièrement l'utilisation de ces anticorps pour la mise en oeuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* de pathologies liées à la  
5 surproduction, ou à l'inverse, à l'insuffisance, voire l'absence de production de lipase dans l'organisme.

Cette méthode de diagnostic *in vitro*, réalisée à partir d'un échantillon biologique prélevé chez un patient, comprend une étape de mise en présence de cet échantillon avec un ou plusieurs anticorps selon l'invention, suivie d'une étape de  
10 détection des éventuels complexes anticorps-LPH formés lors de l'étape précédente.

A ce titre l'invention concerne également un kit pour la mise en oeuvre d'une méthode de détection ou de diagnostic *in vitro* susmentionnée, comprenant:

- des anticorps tels que décrits ci-dessus, avantageusement marqués de  
15 manière radioactive ou enzymatique, ainsi que les réactifs pour la constitution d'un milieu propice à la réalisation de la réaction immunologique entre ces anticorps et la LPH,

- les réactifs permettant la détection des complexes immunologiques formés entre ces anticorps et la LPH.

L'invention concerne également l'association de l'activité lipasique de type  
20 pancréatique obtenue selon l'invention avec une activité de type colipase et l'utilisation du produit de cette association notamment dans le cadre du traitement de pathologies associées à un déficit de production de lipase dans l'organisme, telles que la mucoviscidose ou dans le cadre du traitement de désordre alimentaire,  
25 telle que l'obésité.

L'activité de type colipase peut provenir d'extraits de plantes exprimant une colipase recombinante (par exemple la colipase humaine) ou un dérivé de cette colipase, un dérivé étant toute protéine ou polypeptide dérivé de la colipase susmentionnée par addition et/ou suppression et/ou substitution d'un (ou plusieurs)  
30 acide(s) aminé(s), cette protéine ou ce polypeptide dérivé possédant une activité de type colipase. Plus particulièrement, l'activité de type colipase peut provenir d'une colipase ou d'un dérivé de celle-ci purifié ou partiellement purifié à partir de plantes ou d'extraits de plantes exprimant une colipase recombinante (par exemple la colipase pancréatique humaine) ou un dérivé de cette colipase. L'activité de type  
35 colipase, par exemple la colipase humaine peut donc être produite à partir d'une plante transgénique selon les méthodes décrites ci-dessus pour la production de la lipase pancréatique. La colipase peut notamment être co-exprimée dans la même plante transgénique que la lipase pancréatique. Elle peut également être exprimée

dans une plante différente et associée ensuite. L'activité de type colipase peut également provenir d'extraits d'origine animale.

L'invention concerne donc également, le cas échéant de façon analogue à ce qui est décrit pour l'activité lipase pancréatique selon l'invention :

5           L'utilisation d'une séquence nucléotidique recombinante contenant, d'une part, un ADNc codant pour une colipase de mammifères ou pour une protéine ou un polypeptide dérivé, et d'autre part, les éléments permettant à une cellule végétale de produire la colipase, ou la protéine ou le polypeptide dérivé, codé par ledit ADNc, notamment un promoteur et un terminateur de transcription reconnus par la  
10           machinerie transcriptionnelle des cellules végétales, pour la transformation de cellules de plantes en vue de l'obtention, à partir de ces cellules, ou de plantes obtenues à partir de ces dernières, d'une colipase recombinante de mammifères, ou d'une protéine ou polypeptide dérivé,

15           L'utilisation des séquences pour la co-transformation de cellules de plantes en vue de l'obtention, à partir de ces cellules, ou de plantes obtenues à partir de ces dernières, d'une lipase pancréatique et d'une co-lipase recombinantes de mammifères, ou de leur dérivés,

20           - la séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle contient d'une part la séquence codante pour une colipase ou une protéine ou polypeptide dérivé et d'autre part, les éléments permettant à une cellule végétale de produire une colipase pancréatique ou une protéine ou polypeptide dérivé codé par ladite séquence, notamment un promoteur et un terminateur de transcription reconnus par la machinerie transcriptionnelle des cellules végétales,

25           - la séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle contient d'une part les séquences codantes pour une lipase pancréatique et une colipase ou les protéines ou polypeptides dérivés et d'autre part, les éléments permettant à une cellule végétale de produire une lipase pancréatique et une colipase ou les protéines ou polypeptides dérivés codés par ladite séquence, notamment un promoteur et un  
30           terminateur de transcription reconnus par la machinerie transcriptionnelle des cellules végétales.

          -un vecteur, notamment plasmide, contenant une séquence nucléotidique telle que définie ci-dessus, insérée en un site non essentiel pour sa réplication.

          -un hôte cellulaire, notamment toute bactérie telle que *Agrobacterium tumefaciens*, transformé par un vecteur tel que défini ci-dessus,

35           -un procédé d'obtention de colipase recombinante, ou d'une protéine ou un polypeptide dérivé, caractérisé en ce qu'il comprend:

          - la transformation de cellules végétales, notamment à l'aide d'un hôte cellulaire selon l'invention, lui-même transformé par un vecteur selon l'invention,

de manière à intégrer dans le génome de ces cellules une séquence recombinante selon l'invention

- le cas échéant, l'obtention de plantes transformées à partir des cellules transformées susmentionnées,

5           - la récupération de la colipase recombinante ou de la protéine ou polypeptide dérivé produit dans lesdites cellules ou plantes transformées susmentionnées, notamment par extraction, suivie, le cas échéant, par une purification.

10           -un procédé de co-obtention de lipase pancréatique et de colipase recombinantes, ou de protéine ou polypeptides dérivés, caractérisé en ce qu'il comprend:

15           - la transformation de cellules végétales, notamment à l'aide d'un hôte cellulaire selon l'invention, lui-même transformé par un vecteur selon l'invention, de manière à intégrer dans le génome de ces cellules une séquence recombinante selon l'invention

- le cas échéant, l'obtention de plantes transformées à partir des cellules transformées susmentionnées,

20           - la récupération de la lipase pancréatique et de la colipase recombinantes ou des protéines ou polypeptides dérivés produit dans lesdites cellules ou plantes transformées susmentionnées, notamment par extraction, suivie, le cas échéant, par une purification.

25           -les plantes, *ou parties* de plantes, *notamment feuilles et/ou fruits et/ou semences et/ou* cellules de plantes, transformés génétiquement, caractérisés en ce qu'elles contiennent une (ou plusieurs) séquence(s) nucléotidique(s) recombinante(s) selon l'invention, intégrée(s) de façon stable dans leur génome ces plantes étant choisies notamment parmi le colza, le tabac, le maïs, le pois, la tomate, la carotte, le blé, l'orge, la pomme de terre, le soja, le tournesol, la laitue, le riz; la luzerne, *et la betterave*.

30           -la colipase recombinante ou protéine ou polypeptide dérivé caractérisé en ce qu'elle est obtenue selon l'invention.

-l'association de lipase pancréatique et de colipase recombinantes ou protéine ou polypeptide dérivés caractérisé en ce qu'elle est obtenu selon le procédé de l'invention,

35           -l'extrait végétal à activité enzymatique tel qu'obtenu par mise en oeuvre d'un procédé selon l'invention, caractérisé en ce qu'il contient de la lipase pancréatique recombinante et/ou de la colipase recombinante ou les protéines ou polypeptides dérivés,

- les compositions pharmaceutiques, caractérisée en ce qu'elles comprennent une activité de type colipase pancréatique (par exemple la colipase pancréatique humaine), ou de ses dérivés, éventuellement associée à une activité de type lipase pancréatique (par exemple LPH), le cas échéant en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

- le procédé, notamment de bioconversion enzymatique, ou de biocatalyse, par mise en oeuvre d'une ou plusieurs réactions enzymatiques dans le domaine industriel, agro-alimentaire ou agro-industriel, notamment dans l'industrie des corps gras, de la lipochimie et l'industrie laitière, ces réactions enzymatiques étant effectuées au moyen de plantes, ou parties de plantes, notamment feuilles et/ou fruits et/ou semences et/ou cellules de plantes, transformés génétiquement, selon l'invention, d'une activité de type colipase pancréatique (par exemple la colipase pancréatique humaine), ou des polypeptides dérivés éventuellement associée à une activité de type lipase pancréatique (par exemple LPH),

- les préparations enzymatiques à destination industrielle, agro-alimentaire ou agro-industrielle comprenant un (ou plusieurs) extrait(s) végétal (végétaux) à activité enzymatique selon l'invention, et/ou une colipase pancréatique purifiée ou partiellement purifiée (par exemple la colipase pancréatique humaine), ou des polypeptides dérivés éventuellement associée à une activité de type lipase pancréatique (par exemple LPH),

- l'utilisation de plantes, ou parties de plantes, notamment feuilles et/ou fruits et/ou semences et/ou cellules de plantes, transformés génétiquement, selon l'invention et exprimant une activité de type colipase pancréatique (par exemple la colipase pancréatique humaine), ou des polypeptides dérivés éventuellement associée à une activité de type lipase pancréatique (par exemple LPH), pour la mise en oeuvre, à l'échelle industrielle, de réactions de bioconversions enzymatiques, ou de biocatalyses, telles que hydrolyses, ou trans-estérifications enzymatiques,

- le procédé de biocatalyse utilisant des plantes, ou parties de plantes, notamment feuilles et/ou fruits et/ou semences et/ou cellules de plantes, transformés génétiquement, selon l'invention, lesdites plantes, ou fragments, ou cellules, ou semences, étant utilisées à la fois en tant que source d'une activité de type colipase pancréatique (par exemple la colipase pancréatique humaine éventuellement associée à une activité de type lipase pancréatique (par exemple LPH) et substrat réactionnel.

- l'utilisation de plantes, ou parties de plantes, notamment feuilles et/ou fruits et/ou semences et/ou cellules de plantes, transformés génétiquement, selon l'invention et exprimant une activité de type colipase pancréatique (par exemple la

colipase pancréatique humaine éventuellement associée à une activité de type lipase pancréatique (par exemple LPH), pour l'obtention de biocarburants.

- le procédé d'obtention de biocarburant par addition d'alcool, notamment de méthanol ou d'éthanol, à un broyat de tout ou partie de plantes, transformées génétiquement selon la l'invention et/ou d'une activité de type colipase pancréatique (par exemple la colipase pancréatique humaine) éventuellement associée à une activité de type lipase pancréatique (par exemple LPH), et récupération de biocarburant, notamment par filtration.

#### EXEMPLES

I. CONSTRUCTION DE GENES CHIMERIQUES CODANT LA LIPASE PANCREATIQUE RECOMBINANTE HUMAINE (LPH) ET PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS LES FEUILLES ET GRAINES DE SOLANACEES.

I.1. CONSTRUCTION DE GENES CHIMERIQUES CODANT LA LPH RECOMBINANTE ET PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS LE TABAC

L'expression dans les feuilles et les graines de tabac du gène codant pour la lipase pancréatique humaine (LPH) a nécessité les séquences régulatrices suivantes:

1. le promoteur constitutif double 35S (Pd35S) du CaMV (virus de la mosaïque du chou-fleur).

Il correspond à une duplication des séquences activant la transcription situées en amont de l'élément TATA du promoteur 35S naturel (Kay *et al.*, 1987);

2. la séquence terminatrice de transcription, terminateur polyA 35S, qui correspond à la région 3' non codante de la séquence du virus à ADN bicaténaire circulaire de la mosaïque du chou-fleur produisant le transcrit 35S .

Les constructions des différents plasmides via l'utilisation de techniques d'ADN recombinant dérivent de pBIOC4. Ce plasmide binaire dérive de pGA492 (An *et al.*, 1986) qui contient entre les bordures droite et gauche; issues du plasmide pTiT37 d'*Agrobacterium tumefaciens*, sur son ADN de transfert, les séquences suivantes:

le promoteur constitutif du gène NOS de la nopaline synthase, la séquence codante du gène nptII codant pour la néomycine phosphotransférase II délétée de la région des 8 premiers codons dont le codon initiateur méthionine ATG et fusionnée à la séquence des 14 premiers codons de la séquence codante du gène nos, la séquence codante du gène nos dépourvue de la région des 14 premiers codons, le terminateur nos, une région contenant des sites multiples de clonage (encore désignée polylinker) (HindIII-XbaI-SacI-HpaI-KpnI-ClaI-BglII) précédant le gène cat codant pour la chloramphénicol et les séquences terminatrices du gène 6 du plasmide pTiA6 d'*Agrobacterium tumefaciens* (Liu *et al.*, 1993). Pour

éliminer la quasi-totalité de la séquence codante du gène cat, le plasmide pGA492 a été doublement digéré par SacI (site de restriction du polylinker) et par ScaI (site de restriction présent dans la séquence du gène cat) puis soumis à l'action de l'enzyme T4 DNA polymérase (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant. La ligation du plasmide modifié (20 ng) a été réalisée dans un milieu réactionnel de 10 µl contenant 1 µl du tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham); 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries *Escherichia coli* DH5α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan et al., 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 12 µg/ml tétracycline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Puis, le site de restriction HindIII de l'ADN plasmidique du clone retenu a été modifié en un site de restriction EcoRI à l'aide d'un adaptateur HindIII-EcoRI phosphorylé (Stratagene Cloning Systems). Pour réaliser cette modification, 500 ng d'ADN plasmidique du clone retenu ont été digérés par HindIII, déphosphorylés par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant et coprécipités en présence de 1500 ng d'ADN adaptateur HindIII-EcoRI, 1/10 volume d'acétate de sodium 3M pH 4,8 et 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min. Après centrifugation à 12000 g pendant 30 min., l'ADN précipité a été lavé à l'éthanol 70%, séché, repris dans 8 µl d'eau, porté à 65°C pendant 10 min., puis ligué en présence de 1 µl de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Après inactivation de la T4 DNA ligase à 65°C pendant 10 min., le mélange réactionnel de ligation a été digéré par EcoRI, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, précipité en présence de 1/10 de volume de 3M acétate de sodium pH 4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min., centrifugé à 12000 g pendant 30 min., lavé à l'éthanol 70%, séché, puis ligué comme décrit ci-dessus. Les bactéries *Escherichia coli* DH5α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 12 µg/ml tétracycline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestion enzymatique par HindIII et EcoRI notamment. Le plasmide binaire résultant, qui ne possède plus que les 9 derniers codons de la séquence codante du gène cat et dont le site EcoRI est unique, a été appelé pBIOC4.

La cassette d'expression, constituée du promoteur Pd35S et du terminateur polyA 35S, a été isolée à partir du plasmide pJIT163Δ. Le plasmide pJIT163Δ dérive du plasmide pJIT163 qui dérive lui-même du plasmide pJIT60 (Guerineau et Mullineaux, 1993). Le plasmide pJIT163 possède un codon ATG entre les sites



HindIII et SalI du polylinker. Pour supprimer cet ATG et obtenir le plasmide pJIT163Δ, l'ADN plasmidique pJIT163 a été digéré doublement par HindIII et SalI, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué, précipité en présence de 1/10 de volume de 3M acétate de sodium pH 4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min., centrifugé à 12000 g pendant 30 min., lavé à l'éthanol 70%, séché, soumis à l'action de l'enzyme Klenow (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant, déprotéinisé par extraction avec 1 volume de phénol: chloroforme: alcool isoamylique (25:24:1) puis 1 volume de chloroforme: alcool isoamylique (24:1), précipité en présence de 1/10 volume de 3M acétate de sodium pH 4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min., centrifugé à 12000 g pendant 30 min., lavé à l'éthanol 70%, séché, et enfin, ligué en présence de 1 µl du tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham) et 2,5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries *Escherichia coli* DH5α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 50 µg/ml ampicilline a été extrait selon la méthode de la lyse et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Pour isoler la cassette d'expression constituée du promoteur Pd35S et du terminateur polyA 35S (fragment SacI-XhoI), l'ADN plasmidique du clone pJIT163Δ retenu a été digéré par SacI et XhoI. Le fragment SacI-XhoI, portant la cassette d'expression a été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué, précipité en présence de 1/10 de volume de 3M acétate de sodium pH 4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min., centrifugé à 12000 g pendant 30 min., lavé à l'éthanol 70%, séché, puis soumis à l'action de l'enzyme Mung Bean Nuclease (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant. Cet insert purifié (200 ng) a été cloné dans l'ADN plasmidique de pBIOC4 (20 ng) digéré par EcoRI, traité par l'enzyme Mung Bean Nuclease et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant. La réaction de ligation a été effectuée dans 20 µl en présence de 2 µl de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham), de 2 µl de 50% polyéthylène glycol 8000 et de 5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries *Escherichia coli* DH5α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 12 µl/ml tétracycline, a été extrait selon la méthode de la lyse et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le plasmide résultant a été appelé pBIOC21.

La lipase pancréatique humaine (LPH) est naturellement synthétisée sous forme d'un précurseur de 465 acides aminés. La protéine mature LPH est constituée de 449 acides aminés.

#### I.1.1. CONSTRUCTION DU PLASMIDE BINAIRE CONTENANT PS-LPH.

Le plasmide contenant le cDNA complet codant pour la LPH a été digéré afin de supprimer la séquence codant le peptide signal de la LPH constitué de 16 acides aminés. Cette séquence a été remplacée par celle codant pour le peptide signal PS de la sporamine A de patate douce (Murakami *et al.*, 1986; Matsukoa et Nakamura, 1991) de 23 acides aminés (ATG AAA GCC TTC ACA CTC GCT CTC TTC TTA GCT CTT TCC CTC TAT CTC CTG CCC AAT CCA GCC CAT TCC) en suivant le protocole d'amplification PCR décrit ci-dessus dans le paragraphe I.

Après digestion enzymatique, les fragments d'ADN issus de l'amplification PCR ont été purifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 2%, électroélus, précipités en présence de 1/10 de volume de 3M acétate de sodium pH 4,8 et de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min., centrifugés à 12000 g pendant 30 min., lavés à l'éthanol 70%, séchés, puis ligués à l'ADN plasmidique digéré, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué (Sambrook *et al.*, 1989), soumis à la précipitation alcoolique, séché et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant. La ligation a été réalisée selon le procédé décrit dans à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. L'ADN plasmidique de certains clones retenus a été vérifiée par séquençage à l'aide du kit de séquençage T7<sup>TM</sup> commercialisé par Pharmacia selon la méthode des didésoxynucléotides.

Les séquences du PS et de LPH mature ont été clonées en maintenant leurs phases de lecture ouverte. La séquence de clivage entre les séquences du PS et de LPH mature est Ser-Lys. A partir du plasmide résultant, le fragment portant la séquence de PS-LPH a été isolé par digestion enzymatique, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué, précipité à alcool, séché. Puis, ce fragment d'ADN traité a été ligué à l'ADN plasmidique de pBIOC21 digéré, traité et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant. La ligation, la transformation des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  rendues préalablement compétentes, l'analyse de l'ADN plasmidique des clones obtenus et la séquence

nucléotidique du fragment codant pour la protéine recombinante PS-LPH ont été réalisées comme décrit précédemment. L'ADN plasmidique du vecteur binaire a été introduit par transformation directe dans la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* selon le procédé de Holsters *et al.* (1978).

5 I.1.2. CONSTRUCTION DU PLASMIDE BINAIRE CONTENANT PPS-LPH.

Le plasmide contenant le cDNA complet codant pour la LPH a été digéré afin de supprimer la séquence codant le peptide signal de la LPH constitué de 16 acides aminés. Cette séquence a été remplacée par celle codant pour le peptide  
10 signal PPS de la sporamine A de patate douce (Murakami *et al.*, 1986; Matsukoa et Nakamura, 1991) de 37 acides aminés (ATG AAA GCC TTC ACA CTC GCT CTC TTC TTA GCT CTT TCC CTC TAT CTC CTG CCC AAT CCA GCC CAT TCC AGG TTC AAT CCC ATC CGC CTC CCC ACC ACA CAC GAA CCC GCC) en suivant le protocole d'amplification PCR décrit ci-dessus dans le paragraphe I.

15 Les fragments d'ADN issus de l'amplification PCR ont été traités de façon similaire à celle décrite en I.1.1.

Les séquences du PPS et de LPH mature ont été clonées en maintenant leurs phases de lecture ouvertes. La séquence de clivage entre les deux séquences est Ala-Lys. Le plasmide résultant est traité comme décrit en I.1.1.

20 L'ADN plasmidique du vecteur binaire a été introduit par transformation directe dans la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* selon le procédé de Holsters *et al.* (1978).

I.1.3. CONSTRUCTION DU PLASMIDE BINAIRE CONTENANT PSLGL-LPH.

25 La lipase gastrique de lapin est synthétisée sous forme d'un précurseur composé d'un peptide signal de 22 acides aminés, situé à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale et précédant la séquence polypeptidique de la lipase mature, le clone pJO101 contenant l'ADNc complet codant pour la lipase gastrique de lapin est décrit dans la demande de brevet européen EP542629

30 Le plasmide contenant le cDNA complet codant pour la LPH a été digéré afin de supprimer la séquence codant pour le peptide signal de la LPH constitué de 16 acides aminés. Cette séquence a été remplacée par celle codant pour le peptide signal de la lipase gastrique de lapin constituée des 22 acides aminés suivants: MWVLFMVAALLSALGTTHGLFG (ATG TGG GTG CTT TTC ATG GTG GCA  
35 GCT TTG CTA TCT GCA CTT GGA ACT ACA CAT GGT CTT TTT GGA) en suivant le protocole d'amplification PCR décrit ci-dessus dans le paragraphe I.

Les fragments d'ADN issus de l'amplification PCR ont été traités de façon similaire à celle décrite en I.1.1.

Les séquences du PSLGL et de la LPH mature ont été clonées en maintenant leurs phases de lecture ouvertes (c'est-à-dire, de telle sorte qu'elles constituent une phase ouverte de lecture unique). La séquence de clivage entre les séquences PSLGL et LPH mature est Gly-Lys. Le plasmide résultant est traité  
5 comme décrit en I.A.a.

L'ADN plasmidique du vecteur binaire a été introduit par transformation directe dans la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* selon le procédé de Holsters *et al.* (1978).

#### 10 I.1.4. CONSTRUCTION DU PLASMIDE BINAIRE CONTENANT PSLPH-LPH.

Le plasmide contenant le cDNA complet codant pour la LPH (465 acides aminés) comprend le peptide signal PSLPH de 16 acides aminés (*ATG CTG CCA CTT TGG ACT CTT TCA CTG CTG CTG GGA GCA GTA GCA GGA*).

Le fragment d'ADN portant le cDNA complet codant pour la LPH a été  
15 traité de façon similaire à celle décrite en I.1.1.

La séquence de clivage entre les deux séquences codant pour PSLPH et LPH est GLy-Lys.

L'ADN plasmidique du vecteur binaire a été introduit par transformation directe dans la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* selon le procédé de  
20 Holsters *et al.* (1978).

#### I.2. CONSTRUCTION DE GENES CHIMERIQUES CODANT POUR LA LPH RECOMBINANTE ET PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS LA TOMATE.

Les constructions utilisées sont les mêmes que celles citées pour la  
25 transformation génétique du tabac.

#### II. CONSTRUCTION DE GENES CHIMERIQUES CODANT POUR LA PROTEINE RECOMBINANTE DE COLIPASE PANCREATIQUE HUMAINE (COLPH) ET PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS LES FEUILLES ET GRAINES DE SOLANACEES.

##### 30 II.1. CONSTRUCTION DE GENES CHIMERIQUES CODANT POUR LA COLPH RECOMBINANTE ET PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS LE TABAC

L'expression dans les feuilles et les graines de tabac du gène codant pour la colipase pancréatique humaine (COLPH) a nécessité les séquences régulatrices  
35 décrites dans le cas de la lipase pancréatique humaine en I.1.

Le plasmide binaire pBIOC21 décrit en I.1. est également utilisé.

La colipase pancréatique humaine (COLPH) est naturellement synthétisée sous forme d'un précurseur de 112 acides aminés. La protéine mature COLPH est constituée de 95 acides aminés.

#### II.1.1. CONSTRUCTION DU PLASMIDE BINAIRE CONTENANT PSLGL-COLPH.

La lipase gastrique de lapin est synthétisée sous forme d'un précurseur composé d'un peptide signal de 22 acides aminés, situé à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale et précédant la séquence polypeptidique de la lipase mature, le clone pJO101 contenant l'ADNc complet codant pour la lipase gastrique de lapin est décrit dans la demande de brevet européen EP542629

Le plasmide contenant le cDNA complet codant pour la COLPH a été digéré afin de supprimer la séquence codant le peptide signal de la COLPH constitué de 17 acides aminés. Cette séquence a été remplacée par celle codant pour le peptide signal de la lipase gastrique de lapin constituée des 22 acides aminés suivants: MWVLFMVAALLSALGTTHGLFG (ATG TGG GTG CTT TTC ATG GTG GCA GCT TTG CTA TCT GCA CTT GGA ACT ACA CAT GGT CTT TTT GGA) en suivant le protocole d'amplification PCR décrit ci-dessus dans le paragraphe I.

Les fragments d'ADN issus de l'amplification PCR ont été traités de façon similaire à celle décrite en I.1.1.

Les séquences du PSLGL et de la COLPH mature ont été clonées en maintenant leurs phases de lecture ouvertes (c'est-à-dire, de telle sorte qu'elles constituent une phase ouverte de lecture unique). La séquence de clivage entre les séquences PSLGL et COLPH mature est Gly-Ala. Le plasmide résultant est traité comme décrit en I.1.1.

L'ADN plasmidique du vecteur binaire a été introduit par transformation directe dans la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* selon le procédé de Holsters *et al.* (1978).

#### II.1.2. CONSTRUCTION DU PLASMIDE BINAIRE CONTENANT PSCOLPH-COLPH.

Le plasmide contenant le cDNA complet codant pour la COLPH (112 acides aminés) comprend le peptide signal PSCOLPH de 17 acides aminés (ATG GAG AAG ATC CTG ATC CTC CTG CTT GTC GCC CTC TCT GTG GCC TAT GCA).

Le fragment d'ADN portant le cDNA complet codant pour la COLPH a été traité de façon similaire à celle décrite en I.1.1.

La séquence de clivage entre les deux séquences codant pour PSCOLPH et COLPH est Ala-Lys.

L'ADN plasmidique du vecteur binaire a été introduit par transformation directe dans la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* selon le procédé de Holsters *et al.* (1978).

### III. CONSTRUCTION DE GENES CHIMERIQUES CODANT LA LIPASE PANCREATIQUE RECOMBINANTE HUMAINE (LPH) ET PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS LES GRAINES DE COLZA.

#### III.1.1. CONSTRUCTION DU PLASMIDE BINAIRE CONTENANT LE PROMOTEUR PCRU.

La production dans les graines de colza de la lipase pancréatique humaine (LPH) a nécessité l'insertion de l'ADNc codant pour la LPH entre les séquences régulatrices suivantes:

1. le promoteur PCRU correspondant à la région 5' non codante du gène de la protéine de réserve de graines, la CRUCIFERINE A de radis (Depigny-This *et al.*, 1992) et permettant une expression spécifique dans les graines;

2. la séquence terminatrice de transcription, terminateur polyA 35S, qui correspond à la région 3' non codante de la séquence du virus à ADN bicaténaire circulaire de la mosaïque du chou-fleur produisant le transcrit 35S.

Pour obtenir un plasmide binaire similaire à pBIOC21 mais dont le promoteur Pd35S a été remplacé par le promoteur PCRU, le fragment "EcoRI traité à la Klenow-BamHI", contenant le promoteur PCRU a été isolé à partir du plasmide pBI221-CRURSP dérivant de pBI221 (commercialisé par Clontech) par remplacement du promoteur 35S par le promoteur PCRU.

Le fragment "EcoRI traité à la Klenow-BamHI" portant le promoteur PCRU a été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué (Sambrook *et al.*, 1989), soumis à la précipitation alcoolique, séché et ligué à l'ADN plasmidique de pJIT163 (décrit dans le paragraphe I.), digéré par KpnI, traité à la T4 DNA Polymérase (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant, puis digéré par BamHI, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué (Sambrook *et al.*, 1989), soumis à la précipitation alcoolique, séché et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant. La ligation a été réalisée avec 20 ng du vecteur déphosphorylé décrit ci-dessus et 200 ng de fragments d'ADN "EcoRI traité à la Klenow-BamHI" dans un milieu réactionnel de 20 µl en présence de 2 µl de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham), de 2 µl de 50% polyéthylène glycol 8000 et de 5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries *Escherichia coli* DH5α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur un milieu contenant 50 µg/ml d'ampicilline, a été extrait selon la

méthode de la lyse et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction. Le plasmide résultant a été appelé pBIOC27.

La cassette d'expression, constituée du promoteur PCRU et du terminateur polyA 35S a été isolée à partir de pBIOC27 par digestion totale XhoI suivie d'une digestion partielle EcoRI. Elle a été purifiée par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroéluée, soumise à la précipitation alcoolique, séchée, traitée à la Klenow (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant et liguée à l'ADN plasmidique de pBIOC4 au site EcoRI traité à la Klenow et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant. La ligation a été réalisée avec 20 ng du vecteur déphosphorylé décrit ci-dessus et 200 ng de fragments d'ADN XhoI-EcoRI décrits ci-dessus dans un milieu réactionnel de 20 µl en présence de 2 µl de tampon T4 DNA ligase x 10 (Amersham), de 2 µl de 50% polyéthylène glycol 8000 et de 5 U d'enzyme T4 DNA ligase (Amersham) à 14°C pendant 16 heures. Les bactéries *Escherichia coli* DH5α rendues préalablement compétentes, ont été transformées (Hanahan, 1983). L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur un milieu contenant 12 µg/ml de tétracycline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestion enzymatique par des enzymes de restriction appropriés. Le plasmide résultant a été appelé pBIOC28.

#### III.1.2. CONSTRUCTION DU PLASMIDE BINAIRE CONTENANT PSLPH-LPH.

Le fragment portant la séquence PSLPH-LPH a été ligué à l'ADN plasmidique de pBIOC28 digéré, traité et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant.

La ligation, la transformation des bactéries *Escherichia coli* DH5α rendues préalablement compétentes, l'analyse de l'ADN plasmidique des clones obtenus et la séquence nucléotidique du fragment codant pour la protéine recombinante PSLPH-LPH ont été réalisées comme décrit précédemment. L'ADN plasmidique du vecteur binaire a été introduit par transformation directe dans la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* selon le procédé de Holsters *et al.* (1978).

#### IV. CONSTRUCTION DE GENES CHIMERIQUES CODANT LA COLIPASE PANCREATIQUE RECOMBINANTE HUMAINE (COLPH) ET PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS LES GRAINES DE COLZA.

##### IV.1.1. CONSTRUCTION DU PLASMIDE BINAIRE CONTENANT PSCOLPH-COLPH SOUS CONTROLE DU PROMOTEUR PCRU.

Le fragment portant la séquence PSCOLPH-COLPH a été ligué à l'ADN plasmidique de pBIOC28 digéré, traité et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase

alcaline d'intestin de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations du fabricant.

La ligation, la transformation des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  rendues préalablement compétentes, l'analyse de l'ADN plasmidique des clones obtenus et la séquence nucléotidique du fragment codant pour la protéine recombinante PSCOLPH-COLPH ont été réalisées comme décrit précédemment. L'ADN plasmidique du vecteur binaire a été introduit par transformation directe dans la souche LBA4404 d'*Agrobacterium tumefaciens* selon le procédé de Holsters *et al.* (1978).

## V. CONSTRUCTION DE GENES CHIMERIQUES CODANT LA LIPASE PANCREATIQUE RECOMBINANTE HUMAINE (LPH) ET PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS LES SEMENCES DE MAÏS.

### V.1.1. CONSTRUCTION DE PLASMIDES CONTENANT PSLPH-LPH ET PERMETTANT UNE EXPRESSION CONSTITUTIVE DANS LES SEMENCES DE MAÏS.

L'expression constitutive dans les semences de maïs de la séquence nucléotidique animale codant pour la lipase pancréatique humaine (LPH) a nécessité les séquences régulatrices suivantes :

#### 1. un des deux promoteurs permettant une expression constitutive :

- promoteur actine de riz suivi de l'intron actine de riz (PAR-IAR) contenu dans le plasmide pAct1-F4 décrit par McElroy *et al.* (1991) ;

- promoteur constitutif double 35S (Pd35S) du CaMV (virus de la mosaïque du chou-fleur). Il correspond à une duplication des séquences activant la transcription situées en amont de l'élément TATA du promoteur 35S naturel (Kay *et al.*, 1987);

#### 2. un des deux terminateurs :

- la séquence terminatrice de transcription, terminateur polyA 35S, qui correspond à la région en 3' non codante de la séquence du virus à ADN bicaténaire circulaire de la mosaïque du chou-fleur produisant le transcrit 35S;

- la séquence terminatrice de transcription, terminateur polyA NOS, qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline .

Le plasmide où la séquence codant pour PSLPH-LPH est placée sous contrôle de PAR-IAR a été obtenu par clonage du fragment portant la séquence codant pour PSLPH-LPH dans pBSII-PAR-IAR-TNOS.

Le fragment portant la séquence codant pour PSLPH-LPH a été isolé par digestion enzymatique, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8%, électroélué, soumis à la précipitation alcoolique, séché, puis traité. Le plasmide



pBSII-PAR-IAR-tNOS a été digéré, purifié, traité et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations des fabricants. La ligation, la transformation des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  rendues préalablement compétentes, l'analyse de l'ADN plasmidique des clones obtenus et la séquence nucléotidique du fragment codant pour la protéine recombinante PSLPH-LPH ont été réalisées comme décrit précédemment.

Le plasmide pBSII-PAR-IAR-TNOS résulte du clonage aux sites "Eco0109I traité à la Klenow et KpnI" de pBSII-TNOS du fragment SnaBI-KpnI portant la séquence correspondant à "PAR-IAR-début de la séquence codante pour le gène gus" isolé à partir du plasmide pAct1-F4. La ligation, la transformation des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  rendues préalablement compétentes, l'analyse de l'ADN plasmidique des clones obtenus ont été réalisées comme décrit précédemment.

Le plasmide pBSII-TNOS a été obtenu par clonage au site EcoRV déphosphorylé de pBSIISK+ commercialisé par Stratagene, du fragment SacI-EcoRI portant la séquence TNOS isolé à partir de pBI121 commercialisé par Clontech par double digestion enzymatique par SacI et EcoRV, soumis à une purification par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%, et traité à l'enzyme T4 DNA polymérase. La ligation, la transformation des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  rendues préalablement compétentes, l'analyse de l'ADN plasmidique des clones obtenus ont été réalisées comme décrit précédemment.

Le plasmide où la séquence codant pour PSLPH-LPH est placée sous contrôle de Pd35S a été obtenu par clonage aux sites "KpnI et BamHI" du plasmide pBSII-T35S du fragment portant la séquence correspondant à "Pd35S-PSLPH-LPH" isolé. La ligation, la transformation des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  rendues préalablement compétentes, l'analyse de l'ADN plasmidique des clones obtenus ont été réalisées comme décrit précédemment.

Le plasmide pBSII-T35S a été obtenu par clonage au site SpeI traité à la Klenow, déphosphorylé du plasmide pBSIISK+ commercialisé par Stratagène, du fragment SmaI-EcoRV portant la séquence T35S isolé à partir de pJIT163 (décrit ci-dessus) par double digestion enzymatique par SmaI et EcoRV, soumis à une purification par électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. La ligation, la transformation des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  rendues préalablement compétentes, l'analyse de l'ADN plasmidique des clones obtenus ont été réalisées comme décrit précédemment.

V.1.2. CONSTRUCTION DE PLASMIDES CONTENANT PSLPH-LPH ET PSLPH-LPH-KDEL RESPECTIVEMENT ET PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS L'ALBUMEN DES SEMENCES DE MAÏS.

L'expression dans l'albumen des semences de maïs du gène codant pour la lipase pancréatique humaine (LPH) a nécessité les séquences régulatrices suivantes :

1. le promoteur du gène de zéine de maïs (Pyzéine) contenu dans le plasmide p63 décrit dans Reina et al., 1990. Le plasmide p63 résulte du clonage de Pyzéine aux sites HindIII et XbaI d'un plasmide pUC18 renfermant, entre ses sites HindIII et EcoRI, la cassette d'expression "P35S-gus-TNOS" de pBI221 commercialisé par Clontech. Il permet une expression dans l'albumen des semences de maïs.

2. la séquence terminatrice de transcription, terminateur polyA NOS, qui correspond à la région en 3' non codante du gène de la nopaline synthase du plasmide Ti d'*Agrobacterium tumefaciens* souche à nopaline .

Le plasmide où la séquence codant pour PSLPH-LPH est placée sous contrôle du Pyzéine, a été obtenu par clonage dans le plasmide p63 du fragment portant la séquence codant pour PSLPH-LPH. La ligation, la transformation des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  rendues préalablement compétentes, l'analyse de l'ADN plasmidique des clones obtenus ont été réalisées comme décrit précédemment.

Dans ce plasmide, la séquence codant pour le térapeptide KDEL a été introduite en amont du codon STOP pour permettre un adressage dans le réticulum endoplasmique.

## VI. CONSTRUCTION DE GENES CHIMERIQUES CODANT LA COLIPASE PANCREATIQUE RECOMBINANTE HUMAINE (COLPH) ET PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS LES SEMENCES DE MAIS.

### VI.1.1. CONSTRUCTION DE PLASMIDES CONTENANT PSCOLPH-COLPH ET PERMETTANT UNE EXPRESSION CONSTITUTIVE DANS LES SEMENCES DE MAIS.

L'expression constitutive dans les semences de maïs de l'ADNc codant pour la colipase pancréatique humaine (COLPH) a nécessité les séquences régulatrices décrites en V.1.1.

Le plasmide où la séquence codant pour PSCOLPH-COLPH est placée sous contrôle de PAR-IAR a été obtenu par clonage du fragment portant la séquence codant pour PSCOLPH-COLPH dans pBSII-PAR-IAR-TNOS.

Le fragment portant la séquence codant pour PSCOLPH-COLPH a été isolé par digestion enzymatique, purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 2%, électroélué, soumis à la précipitation alcoolique, séché, puis traité. Le plasmide pBSII-PAR-IAR-TNOS a été digéré, purifié, traité et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline de veau (Boehringer Mannheim) selon les recommandations des fabricants. La ligation, la transformation des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$

rendues préalablement compétentes, l'analyse de l'ADN plasmidique des clones obtenus et la séquence nucléotidique du fragment codant pour la protéine recombinante PSCOLPH-COLPH ont été réalisées comme décrit précédemment. Le plasmide pBSII-PAR-IAR-TNOS utilisé est décrit en V.1.1.

5 Le plasmide où la séquence codant pour PSCOLPH-COLPH est placée sous contrôle de Pd35S a été obtenu par clonage aux sites "KpnI et BamHI" du plasmide pBSII-T35S du fragment portant la séquence correspondant à "Pd35S-PSLPH-LPH" isolé. La ligation, la transformation des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  rendues préalablement compétentes, l'analyse de l'ADN plasmidique des clones obtenus ont été réalisées comme décrit précédemment.

10 Le plasmide pBSII-T35S a été décrit en V.1.1.

#### VI.1.2. CONSTRUCTION DE PLASMIDES CONTENANT PSCOLPH-COLPH ET PSCOLPH-COLPH-KDEL RESPECTIVEMENT ET PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS L'ALBUMEN DES SEMENCES DE MAÏS.

15 L'expression dans l'albumen des semences de maïs de l'ADNc codant pour la colipase pancréatique humaine (COLPH) a nécessité les séquences régulatrices décrites en V.1.2.

20 Le plasmide où la séquence codant pour PSCOLPH-COLPH est placée sous contrôle du Pyzéine, a été obtenu par clonage dans le plasmide p63 du fragment portant la séquence codant pour PSCOLPH-COLPH. La ligation, la transformation des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  rendues préalablement compétentes, l'analyse de l'ADN plasmidique des clones obtenus ont été réalisées comme décrit précédemment.

25 Dans ce plasmide, la séquence codant pour le térapeptide KDEL a été introduite en amont du codon STOP pour permettre un adressage dans le réticulum endoplasmique.

#### VII. CONSTRUCTION D'UN PLASMIDE BINAIRE COEXPRIMANT LES GENES CHIMERIQUES CODANT LA LIPASE PANCREATIQUE HUMAINE (LPH) ET DE LA COLIPASE PANCREATIQUE HUMAINE (COLPH) RECOMBINANTES ET PERMETTANT UNE EXPRESSION DANS LES FEUILLES ET GRAINES DE SOLANACEES.

##### VII.1. CONSTRUCTION DU PLASMIDE BINAIRE DE COEXPRESSION pBIOC43.

35 Le plasmide binaire de coexpression permet une expression de deux gènes dans le même vecteur binaire.

Le plasmide binaire de coexpression dérive de pBIOC21. Il contient deux cassettes d'expression constituées chacune d'un promoteur Pd35S et d'un

terminateur polyA 35S mais qui diffèrent par le polylinker séparant le promoteur du terminateur. L'une des cassettes d'expression est celle de pBIOC21 déjà décrite en I. L'autre cassette d'expression a été obtenue en remplaçant le polylinker HindIII-BamHI-SmaI-EcoRI de pJIT163D par un adaptateur HindIII-EcoRI portant les sites de restriction PacI, AscI, MluI et HpaI. Cet adaptateur a été obtenu par renaturation des 2 oligodésoxynucléotides 5' AGC TGA TTA ATT AAG GCG CGC CAC GCG TTA AC 3' et 5' AAT TGT TAA CGC GTG GCG CGC CTT AAT TAA TC 3' qui sont complémentaires pour leurs 28 nucléotides 3' terminaux. Cent  $\mu$ moles de chacun de ces deux oligodésoxynucléotides ont été préalablement phosphorylés par action de 10U d'enzyme T4 polynucléotide kinase (New England Biolabs) dans un volume réactionnel total de 10  $\mu$ l contenant 1  $\mu$ l de tampon T4 polynucléotide kinase x 10 (New England Biolabs) et de 3  $\mu$ l d'ATP (95mM). Les deux mélanges réactionnels ont été incubés à 37°C pendant 1 heure, puis à 65°C pendant 20 min. Ils ont été ensuite rassemblés et leur volume a été complété à 500  $\mu$ l. Après extraction avec un volume de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1) et 1 volume de chloroforme:alcool isoamylique (24:1), 50  $\mu$ l de 3M acétate de sodium pH6.0 ont été ajoutés. Le mélange réactionnel a été incubé à 80°C pendant 10 min., puis refroidi lentement à température ambiante. L'ADN a ensuite été précipité en présence de 2,5 volumes d'éthanol absolu à -80°C pendant 30 min., centrifugé à 14000g à 4°C pendant 1 heure, lavé à l'éthanol 70%, centrifugé à 14000g à 4°C pendant 10 min., séché, repris dans 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. Le fragment d'ADN HindIII-EcoRI a ensuite été cloné aux sites HindIII-EcoRI de l'ADN plasmidique pJIT163D préalablement déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant. La réaction de ligation a été effectuée dans un volume réactionnel de 20  $\mu$ l en présence de 1 U de T4 DNA ligase (Gibco-BRL) pour une concentration totale d'ADN de 8,5 nM avec un rapport molaire vecteur/insert de 1 et de 4  $\mu$ l de tampon T4 DNA ligase x 5 (Gibco-BRL) à 25°C pendant 16 heures. Les bactéries, rendues préalablement compétentes, ont été transformées. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 100  $\mu$ g /ml ampicilline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestion enzymatique. Le clone résultant a été appelé pBIOC42. Sa validité a été vérifiée par séquençage à l'aide du kit "Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing" commercialisé par United States Biochemical (USB) selon la méthode des didésoxynucléotides. Les conditions réactionnelles suivent les indications du fabricant excepté pour la dénaturation et l'hybridation. Le milieu réactionnel contenant l'ADN plasmidique (0,5 à 1 pmoles), l'amorce oligonucléotidique (2

pmoles), 10% de DMSO et le tampon réactionnel x 1 (USB), est incubé à 100°C pendant 10 min., puis refroidi brutalement à - 80°C dans la carboglace.

A partir de pBIOC42, le fragment codant pour la cassette d'expression constituée du promoteur Pd35S et du terminateur poly 35S a été isolé par double digestion par SacI et XhoI. Il a été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,75%, puis soumis à l'action du kit "Geneclean II" commercialisé par BIO101 selon les indications du fabricant. La ligation a été réalisée dans un volume réactionnel de 20 µl en présence de 1 U de T4 DNA ligase (Gibco-BRL) pour une concentration totale d'ADN de 8,5 nM avec un rapport molaire vecteur/insert de 1 et de 4 µl de tampon T4 DNA ligase x 5 (Gibco-BRL) à 25°C pendant 16 heures. Les bactéries, E. coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 30 µg / ml de chloramphénicol, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestion enzymatique. Le plasmide résultant a été appelé pBIOC75.

A partir de pBIOC75, le fragment d'ADN portant la cassette d'expression constituée du promoteur Pd35S et du terminateur polyA 35S a été isolée par digestion par KpnI. Il a été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose 0,75%, puis soumis à l'action du kit "Geneclean II" commercialisé par BIO101 selon les indications du fabricant. Puis, ce fragment d'ADN a été ligué à l'ADN plasmidique de pBIOC21 digéré par KpnI et déphosphorylé par l'enzyme phosphatase alcaline d'intestin de veau (New England Biolabs) selon les recommandations du fabricant. La ligation a été réalisée dans un volume réactionnel de 20 µl en présence de 1 U de T4 DNA ligase (Gibco-BRL) pour une concentration totale d'ADN de 8,5 nM avec un rapport molaire vecteur/insert de 1 et 4 µl de tampon T4 DNA ligase x 5 (Gibco-BRL) à 25°C pendant 16 heures. Les bactéries, E. coli DH5 α rendues préalablement compétentes, ont été transformées. L'ADN plasmidique des clones obtenus, sélectionnés sur 12 µg /ml de tétracycline, a été extrait selon la méthode de la lyse alcaline et analysé par digestion enzymatique. Le plasmide résultant a été appelé pBIOC43.

## VII.2. CONSTRUCTION DU PLASMIDE BINAIRE COEXPRIMANT LES GENES CHIMERIQUES CODANT LA LIPASE PANCREATIQUE HUMAINE (LPH) ET DE LA COLIPASE PANCREATIQUE HUMAINE (COLPH) RECOMBINANTES

Les ADNc codant pour les séquences "PSLPH-LPH" et "PSCOLPH-COLPH" ont été clonées chacune sous contrôle du promoteur constitutif Pd35S et du terminateur 35S dans le vecteur de coexpression pBIOC43.

La ligation, la transformation des bactéries *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  rendues préalablement compétentes, l'analyse de l'ADN plasmidique des clones obtenus ont été réalisées comme décrit précédemment.

#### VIII. EXEMPLE D'OBTENTION DE PLANTS DE COLZA TRANSGENIQUES.

Les graines de colza de printemps (*Brassica napus* cv WESTAR ou lignées Limagrain) sont désinfectées pendant 40 minutes dans une solution de Domestos (marque déposée) à 15%. Après 4 rinçages à l'eau stérile, les graines sont mises à germer, à raison de 20 graines par pot de 7 cm de diamètre et 10 cm de haut, sur du milieu minéral de Murashige et Skoog (Sigma M 5519) avec 30g/l de saccharose et solidifié avec de l'agargel à 5g/l. Ces pots sont placés dans une chambre de culture à 26°C avec une photopériode de 16h/8h et sous une intensité lumineuse de l'ordre de 80  $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Après 5 jours de germination, les cotylédons sont prélevés stérilement en coupant chaque pétiole environ 1 mm au-dessus du noeud cotylédonaire.

Parallèlement une préculture d'*Agrobacterium tumefaciens* souche LBA4404, contenant les plasmides, à savoir, le plasmide pGAZE dans lequel a été inséré la séquence codant pour la lipase pancréatique humaine fusionnée à celle codant pour un signal d'adressage (PS, PPS, PSLGL, PSPHP) sous contrôle du promoteur PCRU (ou Pd35S), est réalisée en erlenmeyer de 50 ml, pendant 36 h à 28°C dans 10 ml de milieu bactérien 2YT complémenté avec les antibiotiques utiles à la sélection de la souche utilisée.

Cette préculture sert à ensemercer à 1% une nouvelle culture bactérienne effectuée dans les mêmes conditions. Au bout de 14 h la culture est centrifugée 15 min à 3000 g et les bactéries sont reprises dans un volume équivalent de milieu de germination liquide. Cette suspension est distribuée dans des boîtes de pétri de 5 cm de diamètre à raison de 5 ml/boîte.

L'extrémité sectionnée du pétiole est immergée quelques secondes dans la solution d'agrobactéries ainsi préparées, puis le pétiole est enfoncé de quelques millimètres dans le milieu de régénération. Ce milieu a la même composition de base que le milieu de germination avec en plus 4 mg/l de benzyl-amino-purine (BAP), phytohormone favorisant la néoformation de bourgeons. Dix explants (cotylédon avec pétiole) sont mis en culture par boîte de pétri de 9 cm de diamètre (Greiner référence 664102).

Après 2 jours de coculture dans les mêmes conditions environnementales que les germinations, les explants sont repiqués dans des boîtes phytatray (Sigma, référence P1552) contenant le milieu précédent complémenté avec un agent sélectif: 45 mg/l de sulfate de kanamycine (Sigma, référence K4000) et un

bactériostatique: mélange de 1/6 (en poids) de sel de potassium d'acide clavulanique et de 5/6 sel de sodium d'amoxicilline (Augmentin injectable) à raison de 600 mg/l.

Deux fois de suite, à 3 semaines d'intervalle, les explants sont repiqués stérilement sur du milieu neuf dans les mêmes conditions.

Les bourgeons verts apparus à la fin du deuxième ou du troisième repiquage sont séparés de l'explant et mis en culture individuellement dans des pots transparents de 5 cm de diamètre et de 10 cm de haut contenant un milieu identique au précédent mais dépourvu de BAP. Après 3 semaines de culture la tige du bourgeon transformé est sectionnée et le bourgeon est repiqué dans un pot de milieu frais. Au bout de trois à quatre semaines les racines sont assez développées pour permettre l'acclimatation de la plantule dans un phytotron. Les bourgeons qui ne sont pas verts ou enracinés sont éliminés. Ces plantules sont alors transplantées dans des godets de 7 cm de côté remplis de terreau (norme NF U44551: 40% tourbe brune, 30% bruyère tamisée et 30% sable) saturé en eau. Après deux semaines d'acclimatation en phytotron (température 21°C, photopériode 16h/8h et 84% d'humidité relative), les plantules sont repotées dans des pots de 12 cm de diamètre remplis du même terreau enrichi en engrais retard Osmocote (marque déposée), à raison de 4 g/l de terreau puis transportées en serre (classe S2) régulée à 18°C, avec deux arrosages quotidiens de 2 minutes à l'eau.

Dès l'apparition de fleurs celles-ci sont ensachées (Crispac, référence SM 570y 300 mm\*700 mm) de façon à empêcher la fécondation croisée.

Lorsque les siliques sont arrivées à maturité, elles sont récoltées, séchées, puis battues. Les graines obtenues servent au dosage de l'activité biochimique. La sélection de la descendance transgénique se fait par germination sur un milieu contenant du sulfate de kanamycine à raison de 100 à 150 mg/l (selon les génotypes). Les conditions opératoires sont identiques à celles décrites ci-dessus à ceci près que les germinations sont effectuées en tubes de verre avec une seule graine par tube. Seules les plantules développant des racines secondaires les trois premières semaines sont acclimatées en phytotron avant d'être passées en serre.

## IX. EXEMPLE D'OBTENTION DE PLANTS DE SOLANACEES TRANSGENIQUES.

### IX.1. OBTENTION DE PLANTS DE TABAC TRANSGENIQUES

Les plants de tabac utilisés pour les expériences de transformation (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi* NC et PBD6) sont cultivés *in vitro* sur le milieu de base de Murashige et Skoog (1962) additionné des vitamines de Gamborg *et al.* (1968, Sigma référence M0404) de saccharose à 20 g/l et d'agar (Merck) à 8 g/l. Le pH du milieu est ajusté à 5,8 avec une solution de potasse avant autoclavage à 120°C

pendant 20 min. Les plantules de tabac sont repiquées par bouture des entre-nœuds tous les 30 jours sur ce milieu de multiplication MS20.

Toutes les cultures *in vitro* sont réalisées en enceinte climatisée, dans les conditions définies ci-dessous:

- intensité lumineuse de  $30 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ; photopériode de 16h;
- thermopériode de 26°C le jour, 24°C la nuit.

La technique de transformation utilisée est dérivée de celle de Horsch *et al.* (1985).

Une préculture d'*Agrobacterium tumefaciens* souche LBA4404 contenant les plasmides est réalisée durant 48h à 28°C sous agitation, dans du milieu LB additionné des antibiotiques adéquats. La préculture est ensuite diluée au 50ème dans le même milieu et cultivée dans les mêmes conditions. Après une nuit, la culture est centrifugée (10 min., 3000 g), les bactéries sont reprises dans un volume équivalent de milieu MS30 (30 g/l saccharose) liquide et cette suspension est diluée au 10ème.

Des explants d'environ 1 cm<sup>2</sup> sont découpés à partir des feuilles des plantules décrites ci-dessus. Ils sont ensuite mis au contact de la suspension bactérienne pendant 1h, puis séchés rapidement sur papier filtre et placés sur un milieu de coculture (MS30 solide).

Après 2 jours, les explants sont transférés en boîtes de Pétri sur le milieu de régénération MS30, contenant un agent sélectif, la kanamycine (200 mg/l), un antibiotique, l'augmentin (400 mg/l) et les hormones nécessaires à l'induction de bourgeons (BAP, 1 mg/l et ANA, 0,1 mg/l). Un repiquage des explants est effectué sur le même milieu après 2 semaines de culture. Après 2 semaines supplémentaires, les bourgeons sont repiqués en boîtes de Pétri sur le milieu de développement composé du milieu MS20 additionné de kanamycine et d'augmentin. Après 15 jours, les bourgeons sont repiqués de moitié. L'enracinement prend environ 20 jours, au terme desquels les plantules peuvent être clonées par bouture d'entre-nœuds ou sorties en serre.

## IX.2. OBTENTION DE PLANTS DE TOMATE TRANSGENIQUES.

Les graines de tomate cv. UC82B sont stérilisées au Domestos 10% 15 min. et rincées 3 fois dans de l'eau stérile. Le dernier rinçage est effectué pendant 10 min. sous agitation.

Les graines ainsi stérilisées sont mises à germer sur milieu MSSV/2 (milieu de base de Murashige et Skoog additionné des vitamines de Nitsch (Thomas et Pratt, 1981), de saccharose à 30 g/l, d'agar (Merck) à 8 g/l, pH5,9, pendant 7 ou 8 jours en chambre climatisée (intensité lumineuse de  $30 \mu\text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ , photopériode de 16 h/8 h, 26°C).



La technique de transformation utilisée est dérivée de celle de Fillatti *et al.* (1987).

Une préculture d'*Agrobacterium tumefaciens* souche LBA4404 contenant les plasmides est réalisée pendant 24 h à 28°C sous agitation dans du milieu LB additionné des antibiotiques adéquats. La préculture est ensuite diluée au 50ème dans le même milieu et cultivée dans les mêmes conditions pendant une nuit. La DO à 600 nm est mesurée, les agrobactéries sont centrifugées (10 min, 3000 g) et repris dans du milieu KCMS liquide (décrit dans la publication de Fillatti *et al.*, 1987) de manière à obtenir une DO à 600 nm de 0,8.

Des améliorations techniques ont été apportées à certaines étapes du protocole de Fillatti *et al.* (1987).

La préculture des explants et la coculture sont réalisées comme décrit par Fillatti *et al.* (1987) excepté que le milieu KCMS est supplémenté en acétosyringone (200 mM).

Le milieu de lavage 2Z diffère par l'addition de céfotaxime à 500 mg/l au lieu de carbénicilline. Le milieu de développement utilisé est composé du milieu de base de Murashige et Skoog (Sigma MS6899) additionné des vitamines de Nitsch, de saccharose à 20 g/l, de kanamycine à 50 mg/l, d'augmentin à 200 mg/l, d'ANA à 1 mg/l et de zéatine à 0,5 mg/l.

## X. OBTENTION DE PLANTS DE MAIS TRANSGENIQUES.

### X.1. OBTENTION ET UTILISATION DE CAL DE MAIS COMME CIBLE POUR LA TRANSFORMATION GENETIQUE.

La transformation génétique du maïs, quelle que soit la méthode employée (électroporation; *Agrobacterium*, microfibres, canon à particules), requiert généralement l'utilisation de cellules indifférenciées en divisions rapides ayant conservé une aptitude à la régénération de plantes entières. Ce type de cellules compose le cal friable embryogène (dit de type II) de maïs.

Ces cals sont obtenus à partir d'embryons immatures de génotype H1 II ou (A188 x B73) selon la méthode et sur les milieux décrits par Armstrong (Malze Handbook; (1994) M. Freeling, V. Walbot Eds.; pp. 665-671). Les cals ainsi obtenus sont multipliés et maintenus par repiquages successifs tous les quinze jours sur le milieu d'initiation.

Des plantules sont ensuite régénérées à partir de ces cals en modifiant l'équilibre hormonal et osmotique des cellules selon la méthode décrite par Vain *et al.* (1989). Ces plantes sont ensuite acclimatées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

### X.2. UTILISATION DU CANON À PARTICULES POUR LA TRANSFORMATION GENETIQUE DU MAIS.

Le paragraphe précédent décrit l'obtention et la régénération des lignées cellulaires nécessaires à la transformation ; on décrit ici une méthode de transformation génétique conduisant à l'intégration stable des gènes modifiés dans le génome de la plante. Cette méthode repose sur l'utilisation d'un canon à particules; les cellules cibles sont des fragments de cals décrits dans le paragraphe 1. Ces fragments d'une surface de 10 à 20 mm<sup>2</sup> ont été disposés, 4 h avant bombardement, à raison de 16 fragments par boîte au centre d'une boîte de petri contenant un milieu de culture identique au milieu d'initiation, additionné de 0,2 M de mannitol + 0,2 M de sorbitol. Les plasmides portant les gènes à introduire sont purifiés sur colonne Qiagen®, en suivant les instructions du fabricant. Ils sont ensuite précipités sur des particules de tungsten (M10) en suivant le protocole décrit par Klein (1987). Les particules ainsi enrobées sont projetées vers les cellules cibles à l'aide du canon et selon le protocole décrit par J. Finer (1992).

Les boîtes de cals ainsi bombardées sont ensuite scellées à l'aide de Scellofrais® puis cultivées à l'obscurité à 27°C. Le premier repiquage a lieu 24 h après, puis tous les quinze jours pendant 3 mois sur milieu identique au milieu d'initiation additionné d'un agent sélectif dont la nature et la concentration peuvent varier selon le gène utilisé (voir paragraphe 3). Les agents sélectifs utilisables consistent généralement en composés actifs de certains herbicides (Basta®, Round up®) ou certains antibiotiques (Hygromycine, Kanamycine...).

On obtient après 3 mois ou parfois plus tôt, des cals dont la croissance n'est pas inhibée par l'agent sélection, habituellement et majoritairement composés de cellules résultant de la division d'une cellule ayant intégré dans son patrimoine génétique une ou plusieurs copies du gène de sélection. La fréquence d'obtention de tels cals est d'environ 0,8 cal par boîte bombardée.

Ces cals sont identifiés, individualisés, amplifiés puis cultivés de façon à régénérer des plantules. Afin d'éviter toute interférence avec des cellules non transformées toutes ces opérations sont menées sur des milieux de culture contenant l'agent sélectif.

Les plantes ainsi régénérées sont acclimatées puis cultivées en serre où elles peuvent être croisées ou autofécondées.

## XI. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE LA LIPASE PANCREATIQUE HUMAINE (LPH) DANS LES PLANTES DE TABAC TRANSGENIQUES.

### XI.1. PROTOCOLE.

Le protocole d'extraction de la lipase à partir de feuilles de tabac prélevées sur des plantes en serre est le suivant: 1 g de feuilles (poids frais) est broyé dans l'azote liquide puis à 4°C dans 5 ml de tampon Tris-HCl 50mM pH neutre, additionné d'EDTA 1mM et de  $\beta$ -mercaptoéthanol 10mM, de Triton X-100 0,2%

49

et de NaCl 50mM. Le broyat total est immédiatement centrifugé à 4°C pendant 15 min à 10000 g.

Pour les graines de tabac, l'extraction est réalisée à partir de 0,1 g de graines pour 4 ml de tampon.

L'activité lipasique est déterminée à l'aide d'un pH-STAT par la méthode titrimétrique de Gargouri *et al.* (1995) dans laquelle le substrat utilisé est la tributyrine. L'émulsion de tributyrine (1 ml pour 30 ml d'émulsion) est réalisée au vortex dans un tampon Tris-HCl 2,5mM pH 8,0, NaCl 25mM, et CaCl<sub>2</sub> 5mM. Le dosage consiste à neutraliser l'acide butyrique libéré sous l'action de la lipase par une solution de soude à un pH de consigne de 8,0 et à 37°C. Une unité lipase correspond à la quantité d'enzyme qui provoque la libération d'une micromole d'acides gras en 1 min. à 37°C et dans les conditions optimales de pH (8,0).

Sur le surnageant de centrifugation, un dosage des protéines totales solubles est réalisé.

Un test ELISA en sandwich est également réalisé sur le surnageant de centrifugation avec des anticorps polyclonaux anti-LPH naturelle.

#### XI.2. EXPRESSION AVEC LES PEPTIDES SIGNAUX VEGETAUX ; DOSAGES SUR LES FEUILLES ET LES GRAINES DE TABAC TRANSFORMEES ; TEST ELISA.

En utilisant les méthodes de dosages appropriées connues de l'homme du métier, l'expression des protéines recombinantes dans les feuilles et les graines de tabac transformées est mesurée.

#### XI.3. EXPRESSION AVEC LE PEPTIDE SIGNAL DE LA LPH ; DOSAGE DE L'ACTIVITE LIPASE SUR LES FEUILLES DE TABAC.

En utilisant les méthodes de dosages appropriées connues de l'homme du métier, l'expression des protéines recombinantes dans les feuilles et les graines de tabac transformées est mesurée.

#### XII. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE LA LIPASE PANCREATIQUE HUMAINE DANS LES PLANTES DE TOMATE TRANSGENIQUES.

##### XII.1. PROTOCOLE.

Le protocole d'extraction de la lipase à partir de feuilles et des fruits de tomate est similaire à celui décrit pour les feuilles de tabac, excepté que 1 g de matériel frais est repris dans 4 ml de tampon. L'activité lipasique est déterminée comme décrit pour les feuilles de tabac.

##### XII.2. DOSAGE DANS LES FRUITS DE TOMATE.

L'activité lipasique est déterminée comme décrit pour les feuilles de tabac.

### XIII. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE LA COLIPASE PANCREATIQUE HUMAINE (COLPH) DANS LES PLANTS DE TABAC TRANSGENIQUES.

#### XIII.1. PROTOCOLE.

Le protocole d'extraction de la lipase à partir de feuilles de tabac prélevées sur des plantes en serre est le suivant: 1 g de feuilles (poids frais) est broyé dans l'azote liquide puis à 4°C dans 5 ml de tampon Tris-HCl 50mM pH7,5, additionné d'EDTA 1mM et de  $\beta$ -mercaptoéthanol 10mM, de Triton X-100 0,2% et de NaCl 50mM. Le broyat total est immédiatement centrifugé à 4°C pendant 15 min à 10000 g.

Pour les graines de tabac, l'extraction est réalisée de 0,1 g de graines pour 4 ml de tampon.

L'activité lipasique est déterminée à l'aide d'un pH-STAT par la méthode de Patton *et al.* (1978). L'effet de la colipase sur le retard de l'hydrolyse de les intralipides est déterminé comme suit : les intralipides (0,5 ml) sont dilués dans 10 ml d'une solution composée de Tris-HCl 2mM pH8,0, NaCl 150mM, taurodéoxycholate 4mM,  $\text{CaCl}_2$  1mM, à 40°C. La colipase est ajoutée, puis après 1 min., le mélange est supplémenté en lipase pancréatique ( $10^{-5}$  M) à raison de 10  $\mu$ l.

L'activité de la colipase peut également être mesurée selon la méthode de Ouaged et al. (1982). La lipase est dénaturée à pH 2, ce qui permet cependant de conserver la colipase intacte. L'activité colipase est alors évaluée par la capacité de la préparation à restaurer l'activité d'une préparation de lipase exempte de colipase. Pratiquement, l'échantillon à tester est ajouté au milieu réactionnel, acidifié à pH 2 avec de l'HCl 1N, et après une minute, amené à pH 9 avec du NaOH 1M. Un aliquot de lipase semi-purifiée d'activité potentielle connue est ajoutée. La colipase est mesurée d'après le niveau d'activité lipase restaurée à partir de la lipase inactive.

#### XIV. IMMUNODETECTION DE TYPE "WESTERN" DE LA LPH RECOMBINANTE.

##### XIV.1. LPH EXPRIMEE DANS LES FEUILLES ET GRAINES DE TABAC ET DE COLZA TRANSGENIQUES.

##### XIV.1.1. EXPRESSION AVEC LES PEPTIDES SIGNAUX VEGETAUX ; IMMUNODETECTION DANS LES FEUILLES ET GRAINES DE TABAC ET DE COLZA TRANSFORMEES.

Des expériences d'immunodétection de type "western" ("western-blots") de la LPH ont été réalisées sur les protéines de feuilles de tabac et de graines de tabac et de colza extraites avec le tampon (voir protocole d'extraction ci-dessus). Pour la réalisation de ces expériences, les protéines extraites (30  $\mu$ g protéines totales par

échantillon) sont tout d'abord séparées selon la taille sur gel de polyacrylamide dénaturant à 12,5% puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. On peut également utiliser des gels dénaturants (urée) et séparer sur d'autres critères que la taille. Un anticorps polyclonal anti-lipase pancréatique humaine est utilisé comme sonde et la révélation est effectuée au moyen d'un anticorps anti-IgG approprié couplé à la phosphatase alcaline.

La protéine témoin est la lipase pancréatique humaine naturelle qui migre sous la forme d'une seule bande d'une masse moléculaire apparente d'environ 50 kDa.

Aucune bande n'est détectée dans les extraits protéiques de feuilles et de graines de tabac et de colza non transformées.

#### XIV.1.2. EXPRESSION AVEC LE PEPTIDE SIGNAL DE LA LPH ; IMMUNODETECTION DANS LES FEUILLES ET LES GRAINES DE TABAC TRANSFORMEES.

Des Western blots ont été réalisés sur les protéines de feuilles et de graines de tabac extraites selon le protocole décrit précédemment. Les protéines extraites sont tout d'abord séparées sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE) puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. Un anticorps polyclonal anti-LPH est utilisé comme sonde et la révélation est effectuée au moyen d'un anticorps approprié couplé à la phosphatase alcaline.

La protéine témoin est la lipase pancréatique humaine qui migre sous la forme d'une seule bande de masse moléculaire apparente d'environ 50 kDa. Aucune bande n'est détectée dans les extraits protéiques de feuilles de tabac non transformées (T).

#### XIV.1.3. LPH DANS UN EXTRAIT CONTENANT DES PROTEINES DE FEUILLES DE TABAC TRANSFORMEES: EXPERIENCE DE DEGLYCOSYLATION.

Le protocole d'extraction des protéines pour les expériences de déglycosylation est le suivant: 0,5 g de feuilles (poids frais) sont broyés dans l'azote liquide puis à 4°C dans 1 ml de tampon de dénaturation (tampon phosphate 100mM pH7,5, additionné de  $\beta$ -mercaptoéthanol 1%, d'EDTA 25mM et de SDS 1%). Le broyat est centrifugé à 4°C pendant 15 min à 10000g. Le surnageant est incubé durant 5 min à 100°C afin de réaliser la dénaturation des protéines puis centrifugé 2 min à 10000 g. Le surnageant est ensuite dilué au 10ème dans le tampon de déglycosylation (tampon phosphate 100mM pH7,5, additionné de  $\beta$ -mercaptoéthanol 1%, d'EDTA 25mM, de SDS 0,1% et d'octylglucoside 1%). L'enzyme (N-glycosidase F, PNGase Boehringer) est ajoutée à raison de 1 U pour 100  $\mu$ l de surnageant. Un témoin sans enzyme est réalisé pour chaque échantillon.

La déglycosylation de la protéine témoin (lipase pancréatique humaine) a lieu dans les mêmes conditions. Les différents échantillons protéiques sont incubés à température ambiante durant 8 heures. Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et transférées sur membrane de nitrocellulose comme décrit dans le paragraphe précédent.

#### XV. IMMUNODETECTION DE TYPE "WESTERN" DE LA COLPH RECOMBINANTE.

Des expériences d'immunodétection de type "Western" ("Western-blots") (Renart et Sandoval, 1984) de la COLPH ont été réalisées sur les protéines de feuilles de tabac et de graines de tabac et de colza extraites avec le tampon (voir protocole d'extraction ci-dessus). Pour la réalisation de ces expériences, les protéines extraites (30 µg protéines totales par échantillon) sont tout d'abord séparées sur gel de polyacrylamide dénaturant selon la méthode Tris-tricine d'Okajima *et al.* (1993) puis transférés sur une membrane de nitrocellulose. Un anticorps polyclonal anti-colipase pancréatique humaine est utilisé comme sonde et la révélation est effectuée au moyen d'un anticorps anti-IgG approprié couplé à la phosphatase alcaline.

#### XVI. PURIFICATION DE LA LIPASE PANCREATIQUE HUMAINE A PARTIR DE PLANTES.

##### XVI.1. PURIFICATION DE LA LPH À PARTIR DE FEUILLES DE TABAC

La lipase pancréatique humaine recombinante est purifiée par chromatographie d'échange d'ions sur colonne DEAE-Fast Flow (Pharmacia) équilibrée dans du tampon Tris-acétate 50mM pH7,0. La colonne est lavée avec le même tampon jusqu'à ce que l'absorption à 280 nm soit inférieure à DO 0,05. L'activité enzymatique fixée est éluée à l'aide d'un gradient linéaire de sel dans le même tampon (0 à 0,5M NaCl) en utilisant 5 volumes de colonne. Les fractions contenant l'activité enzymatique sont rassemblées. Elles sont soumises à une filtration sur Sephadex G-100.

#### XVII. PURIFICATION DE LA COLIPASE PANCREATIQUE HUMAINE A PARTIR DE PLANTES.

La protéine est purifiée selon les procédés classiques de purification des protéines bien connus de l'homme du métier.

#### XVIII. SYNTHESE D'ESTERS D'ACIDES GRAS.

Les essais ont été réalisés avec des graines de colza non transformées, la lipase étant apportée:

- soit sous forme de préparation enzymatique immobilisée (lipozyme (NOVO)) ou libre (lipase pancréatique humaine),

- soit sous forme de graines de tabac transformées avec le gene de la lipase pancréatique humaine.

Les réactions d'estérification sont conduites à 37°C pendant 16 heures dans des flacons de verre bouchés hermétiquement disposés sur une table d'agitation (250 rpm). Le solvant organique utilisé est l'hexane dans lequel les acides gras sont solubles. Le méthanol est ajouté en proportion stoechiométrique à la quantité théorique de triacylglycérol contenu dans les graines de colza.

Le composant majeur des acides gras de colza est l'acide oléique, aussi le témoin de référence choisi est-il un ester méthylique de l'acide oléique. Le suivi de synthèse se fait par chromatographie couche mince (CCM). Le solvant de migration est un mélange d'hexane, diéthyléther, eau (70:10:1). La révélation des plaques se fait à chaud après pulvérisation d'acide sulfurique (5%) dans de l'éthanol.

L'utilisation de la lipase pancréatique recombinante selon l'invention permet d'obtenir le produit attendu qui est l'ester de méthyle de l'acide oléique.

#### XIX. TEST D'ACTIVITE DE LA LIPASE PANCREATIQUE HUMAINE

Le test d'activité est réalisé à l'aide des réactifs Lipase - PST<sup>TM</sup>Sigma Diagnostics (Méthode N°805) selon les recommandations du fabricant. La procédure est basée sur la méthode colorimétrique de Imamura et al. (Clin. Chem. 35: 1126, 1989). Le 1,2 diglycéride est hydrolysé en 2-monoglycéride et en acides gras. Le 2-monoglycéride est ensuite mesuré par réactions enzymatiques couplées catalysées par la lipase monoglycéride, la glycérol kinase, la glycérphosphate oxydase et la peroxydase. Le test est hautement sensible et spécifique pour la lipase pancréatique grâce à la co-lipase et au désoxycholate utilisés comme activateurs.

Des mesures ont été réalisées sur les échantillons suivants :

- 2 extraits protéiques de feuilles de tabac transformées avec LBA4404 renfermant la plasmide binaire contenant PSLPH-LPH. Les plantes ont été analysées après 3 semaines de sortie en serre.

- 1 extrait protéique de feuille de tabac non transformée (témoin négatif)

- 1 extrait protéique de feuille de tabac non transformée mélangé à de la lipase pancréatique humaine purifiée commercialisée par Sigma (référence : L9780) à 500 U/l (reconstruction)

Les valeurs obtenues sont les suivantes :

- 270 U/l pour le témoin négatif

- 874 U/L pour la reconstruction

- 1113 U/l pour un des échantillons

- 1572 U/l pour l'autre échantillon.

Ces résultats mettent en évidence la présence d'une activité lipasique chez les deux échantillons.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- An G., Plant Physiol., 81, 86-91 (1986).
- 5      Anderson O.D. et Greene F.C., T.A.G., 77, 689-700 (1989).
- Barta *et al.*, Plant Mol. Biol., 6, 347-357 (1986).
- Bednarek S. Y. et Ralkhel N. V., The Plant Cell, 3, 1195-1206 (1991).
- 10      Bevan *et al.*, Nature, 304, 184-187 (1983).
- Bevan M., Nucleic Acids. Res., 12, 8711-8721 (1984).
- 15      Bodmer M.W. *et al.*, Biochem Biophys. Acta, 909, 237-244 (1987).
- Borgström *et al.*, FEBS Letter, 108, 407-410 (1979).
- Cornelissen *et al.*, Nature, 321, 531-532 (1986).
- 20      Depigny-This *et al.*, Plant. Mol. Biol., 20, 467-479 (1992).
- Duan R. *et al.*, Pancreas, 6, 565-602 (1991).
- 25      Egloff *et al.*, Protein Sci. 4, 144-57 (1995).
- Erlanson-Albertsson, Esterases, Lipases and Phospholipases, Edts Mackness  
M.I. and Clerc M., Plenum Press, New York (1994).
- 30      Fillatti J.J., Kiser J., Rose R. et Comai L., Biotechnologie, 5, 726-730  
(1987).
- Gargouri Y., Bensalah A., Douchet I., Verger R., Biochem. Biophys. Act.,  
1257, 223-229 (1995)
- 35      Gargouri Y. *et al.*, Biochem. Biophys. Act., 1006, 255-271 (1989).
- Gaubier *et al.*, Mol. Gen. Genet., 238, 409-418 (1993).



Guerineau F., Mullineaux P., Plant Molecular Biology LABFAX, Groy R.R.D. (Ed), Nios. Scientific Publishers, Blackwell Scientific Publications, 121-147 (1993).

5

Hanahan D., J. Mol. Biol., 166, 557-580 (1983).

Holsters *et al.*, Mol. Gen. Genet., 163, 181-187 (1978).

10

Horsch R.B., Fry J.E., Hoffmann N.L., Eichholtz D. et Rogers S.G., Science, 227, 1229-1231 (1985).

Jouanin *et al.*, Plant Sci., 53, 53-63 (1987).

15

Kay *et al.*, Science, 236, 1299-1302 (1987).

Klein, Nature, 327, 70-73 (1987).

Liu *et al.*, Mol. Plant Microb. Interactions, 6, 144-156 (1993).

20

Lowe *et al.*, J. Biol. Biochem, 264, 20042-20048 (1989).

Lowe *et al.*, Biochemistry, 29, 823-828 (1990).

25

McElroy et al., Mol. Gen. Genet., 231, 150-160 (1991).

Matsuoka K., Nakamura K., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 834-838 (1991).

30

Murakami *et al.*, Plant Mol. Biol., 7, 343-355 (1986).

Ni *et al.*, Plant J., 7, 661-676 (1995).

Okajima T. *et al.*, Anal. Biochem., 211, 293-300 (1993).

35

Ouagued M. et al , Biochimie , 64, 301-303 (1982)

Patton J.S. *et al.*, J. Biol. Chem., 253, 4195-4202 (1978).

Reina *et al.*, Nucleic Acid Research, 18, 6426 (1990).

Schroeder M. R., Borkhsenious O. N., Matsuoka K., Nakamura K.  
et Ralkhel N. V., Plant Physiol., 101, 451-458 (1993).

Shonheyder F., et Volquartz K., Acta Physiol. Scand., 9, 57-67 (1945).

Thomas B.R. et Pratt D., Theor. Appl. Genet., 59, 215-219 (1981).

Vain P. *et al.*, Plant Cell Tissue and Organ Culture, 18, 143-151 (1989).

Volhard F., Z. Klin. Med., 42, 414-429 (1901).

Winkler F.K. *et al.*, Nature, 343, 771-774 (1990).

54

## REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'une séquence nucléotidique  
5 recombinante contenant, d'une part, un ADNc  
codant pour un élément du complexe lipase  
pancréatique-colipase de mammifères ou pour une  
protéine ou un polypeptide dérivé, et d'autre  
10 part, les éléments permettant à une cellule  
végétale de produire cet élément, ou la protéine  
ou le polypeptide dérivé, codé par ledit ADNc,  
notamment un promoteur et un terminateur de  
transcription reconnus par la machinerie  
15 transcriptionnelle des cellules végétales, pour  
la transformation de cellules de plantes en vue  
de l'obtention, à partir de ces cellules, ou de  
plantes obtenues à partir de ces dernières, d'un  
élément recombinant du complexe lipase  
20 pancréatique-colipase de mammifères, ou d'une  
protéine ou polypeptide dérivé.

2. Utilisation selon la revendication 1,  
caractérisée en ce que l'élément du complexe  
lipase pancréatique-colipase est la lipase  
pancréatique.

25 3. Utilisation selon la revendication 1,  
caractérisée en ce que l'élément du complexe  
lipase pancréatique-colipase est la colipase.

4. Utilisation des séquences selon les  
revendications 2 et 3 pour la co-transformation  
30 de cellules de plantes en vue de l'obtention, à  
partir de ces cellules, ou de plantes obtenues à  
partir de ces dernières, d'une lipase  
pancréatique et d'une co-lipase recombinantes de  
mammifères, ou de leur dérivés.

5. Séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle contient d'une part la séquence codante pour un élément du complexe lipase pancréatique-colipase ou une protéine ou polypeptide dérivé et d'autre part, les éléments permettant à une cellule végétale de produire un élément du complexe lipase pancréatique-colipase ou une protéine ou polypeptide dérivé codé par ladite séquence, notamment un promoteur et un terminateur de transcription reconnus par la machinerie transcriptionnelle des cellules végétales.

6. Séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'élément du complexe lipase pancréatique-colipase est la lipase pancréatique.

7. Séquence nucléotidique recombinante selon la revendication 5, caractérisée en ce que l'élément du complexe lipase pancréatique-colipase est la colipase.

8. Séquence nucléotidique recombinante, caractérisée en ce qu'elle contient d'une part les séquences codantes pour une lipase pancréatique et une colipase ou les protéines ou polypeptides dérivés et d'autre part, les éléments permettant à une cellule végétale de produire une lipase pancréatique et une colipase ou les protéines ou polypeptides dérivés codés par ladite séquence, notamment un promoteur et un terminateur de transcription reconnus par la machinerie transcriptionnelle des cellules végétales.

9. Vecteur, notamment plasmide, contenant une séquence nucléotidique selon l'une des

revendications 5 à 8, insérée en un site non essentiel pour sa répllication.

10. Hôte cellulaire, notamment toute bactérie telle que *Agrobacterium tumefaciens*, transformé par un vecteur selon la revendication 9.

11. Procédé d'obtention d'un élément du complexe lipase pancréatique-colipase recombinant, ou d'une protéine ou un polypeptide dérivé, caractérisé en ce qu'il comprend:

10 - la transformation de cellules végétales, notamment à l'aide d'un hôte cellulaire selon la revendication 10, lui-même transformé par un vecteur selon la revendication 9, de manière à intégrer dans le génome de ces cellules une séquence recombinante selon la revendication 5

15 - le cas échéant, l'obtention de plantes transformées à partir des cellules transformées susmentionnées,

20 - la récupération de l'élément du complexe lipase pancréatique-colipase recombinant ou de la protéine ou polypeptide dérivé produit dans lesdites cellules ou plantes transformées susmentionnées, notamment par extraction, suivie, le cas échéant, par une purification.

25 12. Procédé d'obtention selon la revendication 11, caractérisé en ce que l'élément du complexe lipase pancréatique-colipase est la lipase pancréatique.

30 13. Procédé d'obtention selon la revendication 12, caractérisé en ce que l'élément du complexe lipase pancréatique-colipase est la colipase.

14. Procédé de co-obtention de lipase pancréatique et de colipase recombinantes, ou de

protéine ou polypeptides dérivés, caractérisé en ce qu'il comprend:

5       - la transformation de cellules végétales, notamment à l'aide d'un hôte cellulaire selon la revendication 10, lui-même transformé par un vecteur selon la revendication 9, de manière à intégrer dans le génome de ces cellules une séquence recombinante selon la revendication 8

10       - le cas échéant, l'obtention de plantes transformées à partir des cellules transformées susmentionnées,

15       - la récupération de la lipase pancréatique et de la colipase recombinantes ou des protéines ou polypeptides dérivés produit dans lesdites cellules ou plantes transformées susmentionnées, notamment par extraction, suivie, le cas échéant, par une purification.

20       15. Plantes, ou parties de plantes, notamment feuilles et/ou fruits et/ou semences et/ou cellules de plantes, transformés génétiquement, caractérisés en ce qu'elles contiennent une (ou plusieurs) séquence(s) nucléotidique(s) recombinante(s) selon l'une des revendications 5 à 8, intégrée(s) de façon stable dans leur génome  
25       ces plantes étant choisies notamment parmi le colza, le tabac, le maïs, le pois, la tomate, la carotte, le blé, l'orge, la pomme de terre, le soja, le tournesol, la laitue, le riz, la luzerne, et la betterave.

30       16. Lipase pancréatique recombinante ou protéine ou polypeptide dérivé caractérisé en ce qu'elle est obtenu selon le procédé de la revendication 12 ou 14.

35       17. Colipase recombinante ou protéine ou polypeptide dérivé, caractérisée en ce qu'elle

est obtenue selon le procédé de la revendication 13 ou 14.

18. Association de lipase pancréatique et de colipase recombinantes ou protéine ou polypeptide dérivés caractérisé en ce qu'elle est obtenue  
5 selon le procédé de la revendication 14.

19. Extrait végétal à activité enzymatique tel qu'obtenu par mise en oeuvre d'un procédé selon l'une des revendications 11 à 14, caractérisé en ce qu'il contient de la lipase  
10 pancréatique recombinante et/ou de la colipase recombinante ou les protéines ou polypeptides dérivés.

20. Utilisation de plantes, ou parties de plantes selon la revendication 15, et/ou des extraits de plantes selon la revendication 19, et/ou de protéines ou de polypeptides ou d'association de ceux-ci selon les revendications 16 à 18, pour l'obtention de médicaments destinés  
15 au traitement de pathologies associées à un déficit de production de lipase dans l'organisme, telles que la mucoviscidose ou dans le cadre du traitement de désordre alimentaire, telles que l'obésité.

21. Composition pharmaceutique, caractérisée en ce qu'elle comprend des plantes, ou parties de plantes selon la revendication 15, et/ou des extraits de plantes selon la revendication 19, et/ou de protéines ou de polypeptides ou d'association de ceux-ci selon les revendications  
25 16 à 18, le cas échéant en association avec un ou plusieurs véhicules ou excipients pharmaceutiquement acceptables.

22. Utilisation de plantes, ou parties de plantes selon la revendication 15, et/ou des  
35

extraits de plantes selon la revendication 19,  
et/ou de protéines ou de polypeptides ou  
d'association de ceux-ci selon les revendications  
16 à 18, pour l'obtention d'aliments destinés à  
5 l'alimentation humaine ou animale, notamment  
d'aliments fonctionnels plus particulièrement  
destinés à faciliter l'absorption des graisses  
animales ou végétales ingérées par un individu  
sain ou atteint d'une ou plusieurs pathologies  
10 affectant ou non le taux de production de lipase  
gastrique et/ou pancréatique.

23. Aliments fonctionnels caractérisés en ce  
qu'ils comprennent des plantes, ou parties de  
plantes selon la revendication 15, et/ou des  
15 extraits de plantes selon la revendication 19,  
et/ou de protéines ou de polypeptides ou  
d'association de ceux-ci selon les revendications  
16 à 18, le cas échéant en association avec un  
(ou plusieurs) autre(s) composé(s) comestible(s).

24. Utilisation de plantes, ou parties de  
plantes selon la revendication 15, et/ou des  
extraits de plantes selon la revendication 19,  
et/ou de protéines ou de polypeptides ou  
d'association de ceux-ci selon les revendications  
25 16 à 18, pour la mise en oeuvre de réactions  
enzymatiques dans le domaine industriel, agro-  
alimentaire ou agro-industrielle, notamment dans  
l'industrie des corps gras, de la lipochimie et  
l'industrie laitière.

25. Préparations enzymatiques à destination  
industrielle, agro-alimentaire ou agro-  
industrielle, susceptibles d'être utilisées selon  
la revendication 24, et comprenant des plantes,  
ou parties de plantes selon la revendication 15,  
35 et/ou des extraits de plantes selon la



revendication 19, et/ou de protéines ou de polypeptides ou d'association de ceux-ci selon les revendications 16 à 18.

5 26. Utilisation de plantes, ou parties de plantes selon la revendication 15, et/ou des extraits de plantes selon la revendication 19, et/ou de protéines ou de polypeptides ou d'association de ceux-ci selon les revendications  
10 16 à 18, pour l'obtention de biocarburants.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No  
PCT/FR 97/01862

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/55 C12N15/82 A01H5/00 A23K1/14 A61K38/46  
C10L1/02 C10L1/14

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A01H A23K A61K C10L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 93 00426 A (NOVONORDISK AS) 7 January 1993	16, 20,
Y	see page 16, line 20 - page 17, line 5	21, 24, 25
	---	1, 2, 5, 6,
Y	EP 0 449 376 A (GIST BROCADES NV ; MOGEN INT (NL)) 2 October 1991	9-12, 15,
	see page 4, line 28 - page 5, line 4; claims 28, 29	19-26
	---	1, 2, 5, 6,
Y	WO 96 03511 A (TOULOUSE INST NAT POLYTECH ; ALIBERT GILBERT (FR); MOULOUNGUI ZEPHI) 8 February 1996	9-12, 15,
	see the whole document	19-25
	---	24, 25
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 February 1998

Date of mailing of the international search report

06/03/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Maddox, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No  
PCT/FR 97/01862

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GB 2 188 057 A (INST PENYELIDIKAN MINYAK KELAP;UNIV MALAYA) 23 September 1987 see page 1, line 14 - line 21 ---	26
X	MORNEX, J.F., ET AL.: "Transfert des gènes; les enjeux économiques" REVUE DE MALADIES RESPIRATOIRES, vol. 12, 1995, pages 409-413, XP002056437 see page 411, right-hand column & CHAMBON, P.: "Des protéines thérapeutiques cultivées à la ferme. Des plantes à chair humaine" SCIENCES AVENIR, August 1994, pages 64-69, ---	1,2,5,6, 9-12,15, 16,19-26
X	WINKLER, F.K., ET AL.: "Structure of human pancreatic lipase" NATURE, vol. 343, 22 February 1990, pages 771-774, XP002033482 see the whole document ---	16
X	LOWE, M.E., ET AL.: "Cloning and characterization of the human colipase cDNA" BIOCHEMISTRY, vol. 29, 1990, pages 823-828, XP002033483 see the whole document ---	17
X	EP 0 269 595 A (DRACO AB) 1 June 1988 see the whole document ---	17,20,21
X	VAN TILBEURGH, H., ET AL.: "Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography" NATURE, vol. 362, 29 April 1993, pages 814-820, XP002033484 see the whole document ---	18
X	EGLOFF, M.-P., ET AL.: "Crystallographic study of colipase and of the interaction with pancreatic lipase" PROTEIN SCIENCE, vol. 4, 1995, pages 44-57, XP000676440 cited in the application see the whole document ---	18

-/--

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR 97/01862

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GOTTSCHALK, B., ET AL.: "Comparison of two pancreatic enzyme products for the treatment of maldigestion in cystic fibrosis (Mucoviscidosis)" MONATSSCHR. KINDERHEILKD., vol. 136, no. 9, pages 626-629, XP000676451 see the whole document ----	20,21
X	WO 91 06661 A (ENZYTECH INC) 16 May 1991 see the whole document ----	22
A	GOMORD, V., ET AL.: "Plante et médicament un nouveau départ" BIOFUTUR, vol. 154, March 1996, pages 26-30, XP002033486 see page 27, left-hand column ----	1-26
A	EP 0 542 629 A (INST RECH JOUVEINAL ;JOUVEINAL INST RECH (FR)) 19 May 1993 see the whole document ----	1-26
A	WO 94 13816 A (INST RECH JOUVEINAL ;BLANCHARD CLAIRE (FR); BENICOURT CLAUDE (FR);) 23 June 1994 see the whole document ----	1-26
A	LOWE M E ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF HUMAN PANCREATIC LIPASE CDNA" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 33, 25 November 1989, pages 20042-20048, XP000081766 cited in the application see the whole document ----	16
A	WO 93 03161 A (DONSON JON ;DAWSON WILLIAM O (US); GRANTHAM GEORGE L (US); TURPEN) 18 February 1993 see page 31 - page 33 see page 74 - page 75 ----	1-26
A	WO 92 01042 A (NOVONORDISK AS) 23 January 1992 see page 7, line 4 - line 16; claims 1-43 ----	1-26
A	WO 91 18923 A (ASTRA AB) 12 December 1991 see page 11, line 28 - page 12, line 18 ----	19-23
A	WO 86 01532 A (CELLTECH LTD) 13 March 1986 see the whole document -----	20,21

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/FR 97/01862

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9300426 A	07-01-93	EP 0599859 A	08-06-94
EP 0449376 A	02-10-91	AU 649447 B	26-05-94
		AU 7765691 A	21-10-91
		AU 632941 B	14-01-93
		AU 7776691 A	21-10-91
		CA 2056396 A	24-09-91
		EP 0449375 A	02-10-91
		IL 97645 A	18-03-97
		JP 6501838 T	03-03-94
		JP 6502296 T	17-03-94
		WO 9114782 A	03-10-91
		WO 9114772 A	03-10-91
		US 5543576 A	06-08-96
		US 5714474 A	03-02-98
WO 9603511 A	08-02-96	FR 2722798 A	26-01-96
		AU 2984995 A	22-02-96
		CA 2195560 A	08-02-96
		EP 0770134 A	02-05-97
GB 2188057 A	23-09-87	NONE	
EP 0269595 A	01-06-88	AU 608783 B	18-04-91
		AU 8091487 A	26-05-88
		CA 1302878 A	09-06-92
		DE 3786530 A	19-08-93
		DE 3786530 T	28-10-93
		DK 583687 A	21-05-88
		ES 2056838 T	16-10-94
		IE 60452 B	13-07-94
		JP 2575159 B	22-01-97
		JP 63211235 A	02-09-88
		PH 25586 A	08-08-91
		US 5494894 A	27-02-96
WO 9106661 A	16-05-91	NONE	
EP 0542629 A	19-05-93	FR 2683549 A	14-05-93
		AU 3162793 A	15-06-93

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/FR 97/01862

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0542629 A		WO 9310243 A	27-05-93
WO 9413816 A	23-06-94	FR 2699179 A	17-06-94
		AU 5702994 A	04-07-94
		EP 0674714 A	04-10-95
		JP 8504580 T	21-05-96
WO 9303161 A	18-02-93	US 5529909 A	25-06-96
		US 5589367 A	31-12-96
		US 5316931 A	31-05-94
		AU 683412 B	13-11-97
		AU 3351193 A	02-03-93
		CA 2114636 A	18-02-93
		EP 0596979 A	18-05-94
		JP 7503361 T	13-04-95
WO 9201042 A	23-01-92	AU 8219291 A	04-02-92
WO 9118923 A	12-12-91	AP 207 A	18-08-92
		AT 151077 T	15-04-97
		AU 651979 B	11-08-94
		AU 7964591 A	31-12-91
		BG 61165 B	31-01-97
		CA 2083396 A	02-12-91
		CN 1064313 A	09-09-92
		DE 69125489 D	07-05-97
		DE 69125489 T	14-08-97
		EP 0535048 A	07-04-93
		ES 2099159 T	16-05-97
		HK 62497 A	16-05-97
		HR 920771 A	30-04-97
		LT 1736 A,B	25-08-95
		LV 10292 A,B	20-10-94
		PL 166534 B	31-05-95
		SK 164491 A	11-07-95
WO 8601532 A	13-03-86	EP 0191061 A	20-08-86
		GB 2176489 A,B	31-12-86
		JP 2514167 B	10-07-96
		JP 6315387 A	15-11-94

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/FR 97/01862

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 8601532 A		JP 8029081 B	27-03-96
		JP 61503035 T	25-12-86
		US 5691181 A	25-11-97
<hr/>			

## PCT/FR 97/01862

page 1 de 3



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ande internationale No

PCT/FR 97/01862

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	GB 2 188 057 A (INST PENYELIDIKAN MINYAK KELAP; UNIV MALAYA) 23 septembre 1987 voir page 1, ligne 14 - ligne 21 ---	26
X	MORNEX, J.F., ET AL.: "Transfert des gènes; les enjeux économiques" REVUE DE MALADIES RESPIRATOIRES, vol. 12, 1995, pages 409-413, XP002056437 voir page 411, colonne de droite & CHAMBON, P.: "Des protéines thérapeutiques cultivées à la ferme. Des plantes à chair humaine" SCIENCES AVENIR, août 1994, pages 64-69, ---	1,2,5,6, 9-12,15, 16,19-26
X	WINKLER, F.K., ET AL.: "Structure of human pancreatic lipase" NATURE, vol. 343, 22 février 1990, pages 771-774, XP002033482 voir le document en entier ---	16
X	LOWE, M.E., ET AL.: "Cloning and characterization of the human colipase cDNA" BIOCHEMISTRY, vol. 29, 1990, pages 823-828, XP002033483 voir le document en entier ---	17
X	EP 0 269 595 A (DRACO AB) 1 juin 1988 voir le document en entier ---	17,20,21
X	VAN TILBEURGH, H., ET AL.: "Interfacial activation of the lipase-procolipase complex by mixed micelles revealed by X-ray crystallography" NATURE, vol. 362, 29 avril 1993, pages 814-820, XP002033484 voir le document en entier ---	18
X	EGLOFF, M.-P., ET AL.: "Crystallographic study of colipase and of the interaction with pancreatic lipase" PROTEIN SCIENCE, vol. 4, 1995, pages 44-57, XP000676440 cité dans la demande voir le document en entier ---	18
	---	

-/--

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

ande internationale No  
PCT/FR 97/01862

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	GOTTSCHALK, B., ET AL.: "Comparison of two pancreatic enzyme products for the treatment of maldigestion in cystic fibrosis (Mucoviscidosis)" MONATSSCHR. KINDERHEILKD., vol. 136, no. 9, pages 626-629, XP000676451 voir le document en entier ---	20,21
X	WO 91 06661 A (ENZYTECH INC) 16 mai 1991 voir le document en entier ---	22
A	GOMORD, V., ET AL.: "Plante et médicament un nouveau départ" BIOFUTUR, vol. 154, mars 1996, pages 26-30, XP002033486 voir page 27, colonne de gauche ---	1-26
A	EP 0 542 629 A (INST RECH JOUVEINAL ; JOUVEINAL INST RECH (FR)) 19 mai 1993 voir le document en entier ---	1-26
A	WO 94 13816 A (INST RECH JOUVEINAL ; BLANCHARD CLAIRE (FR); BENICOURT CLAUDE (FR);) 23 juin 1994 voir le document en entier ---	1-26
A	LOWE M E ET AL: "CLONING AND CHARACTERIZATION OF HUMAN PANCREATIC LIPASE CDNA" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 264, no. 33, 25 novembre 1989, pages 20042-20048, XP000081766 cité dans la demande voir le document en entier ---	16
A	WO 93 03161 A (DONSON JON ; DAWSON WILLIAM O (US); GRANTHAM GEORGE L (US); TURPEN) 18 février 1993 voir page 31 - page 33 voir page 74 - page 75 ---	1-26
A	WO 92 01042 A (NOVONORDISK AS) 23 janvier 1992 voir page 7, ligne 4 - ligne 16; revendications 1-43 ---	1-26
A	WO 91 18923 A (ASTRA AB) 12 décembre 1991 voir page 11, ligne 28 - page 12, ligne 18 ---	19-23
A	WO 86 01532 A (CELLTECH LTD) 13 mars 1986 voir le document en entier -----	20,21

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Recherche Internationale No

PCT/FR 97/01862

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9300426 A	07-01-93	EP 0599859 A	08-06-94
EP 0449376 A	02-10-91	AU 649447 B	26-05-94
		AU 7765691 A	21-10-91
		AU 632941 B	14-01-93
		AU 7776691 A	21-10-91
		CA 2056396 A	24-09-91
		EP 0449375 A	02-10-91
		IL 97645 A	18-03-97
		JP 6501838 T	03-03-94
		JP 6502296 T	17-03-94
		WO 9114782 A	03-10-91
		WO 9114772 A	03-10-91
		US 5543576 A	06-08-96
		US 5714474 A	03-02-98
WO 9603511 A	08-02-96	FR 2722798 A	26-01-96
		AU 2984995 A	22-02-96
		CA 2195560 A	08-02-96
		EP 0770134 A	02-05-97
GB 2188057 A	23-09-87	AUCUN	
EP 0269595 A	01-06-88	AU 608783 B	18-04-91
		AU 8091487 A	26-05-88
		CA 1302878 A	09-06-92
		DE 3786530 A	19-08-93
		DE 3786530 T	28-10-93
		DK 583687 A	21-05-88
		ES 2056838 T	16-10-94
		IE 60452 B	13-07-94
		JP 2575159 B	22-01-97
		JP 63211235 A	02-09-88
		PH 25586 A	08-08-91
		US 5494894 A	27-02-96
WO 9106661 A	16-05-91	AUCUN	
EP 0542629 A	19-05-93	FR 2683549 A	14-05-93
		AU 3162793 A	15-06-93

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Recherche Internationale No

PCT/FR 97/01862

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 0542629 A		WO 9310243 A	27-05-93
WO 9413816 A	23-06-94	FR 2699179 A	17-06-94
		AU 5702994 A	04-07-94
		EP 0674714 A	04-10-95
		JP 8504580 T	21-05-96
WO 9303161 A	18-02-93	US 5529909 A	25-06-96
		US 5589367 A	31-12-96
		US 5316931 A	31-05-94
		AU 683412 B	13-11-97
		AU 3351193 A	02-03-93
		CA 2114636 A	18-02-93
		EP 0596979 A	18-05-94
		JP 7503361 T	13-04-95
WO 9201042 A	23-01-92	AU 8219291 A	04-02-92
WO 9118923 A	12-12-91	AP 207 A	18-08-92
		AT 151077 T	15-04-97
		AU 651979 B	11-08-94
		AU 7964591 A	31-12-91
		BG 61165 B	31-01-97
		CA 2083396 A	02-12-91
		CN 1064313 A	09-09-92
		DE 69125489 D	07-05-97
		DE 69125489 T	14-08-97
		EP 0535048 A	07-04-93
		ES 2099159 T	16-05-97
		HK 62497 A	16-05-97
		HR 920771 A	30-04-97
		LT 1736 A,B	25-08-95
		LV 10292 A,B	20-10-94
		PL 166534 B	31-05-95
		SK 164491 A	11-07-95
WO 8601532 A	13-03-86	EP 0191061 A	20-08-86
		GB 2176489 A,B	31-12-86
		JP 2514167 B	10-07-96
		JP 6315387 A	15-11-94

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

ande Internationale No

PCT/FR 97/01862

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 8601532 A		JP 8029081 B	27-03-96
		JP 61503035 T	25-12-86
		US 5691181 A	25-11-97
<hr/>			